

**Influencia de las hormonas sexuales endógenas en la respuesta vasodilatadora inducida por acetilcolina. Participación de los prostanoïdes e interacción con el óxido nítrico.**



**TESIS DOCTORAL**

**Aina Martorell Martín**

**2008**

**certifica**

ESTE TRABAJO HA SIDO FINANCIADO CON  
PROYECTOS SUBVENCIONADOS POR:

El fondo de investigaciones sanitarias (PI051767)

Fundación mutua madrileña (MMA-06/08)

*Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión.*

José Ortega y Gasset

*La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.*

Voltaire



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda desinteresada de muchos que viviendo o no en el mundo de la investigación han colaborado de una forma u otra en él.

Cómo no empezar agradeciendo el apoyo incondicional de mis padres, a los que debo todo lo que soy, y cuya ayuda, sin lugar a dudas, ha sido imprescindible en estos cuatro años de arduo trabajo. A mi abuela por no soltarme nunca de la mano y por ser un modelo de mujer luchadora a la que espero llegar a parecerme algún día. Siento no haber tenido este trabajo a tiempo para que me vieras y te sintieras orgullosa de mi, nos faltó poco.

A mis compañeros de facultad Ana y Cris, en especial a Roberto por hacerme ver lo gratificante de la labor de investigación.

Gracias a mis compañeras de trabajo Ana, Rosa y Lara por tantos cafés de mediatarde en el laboratorio, sin los cuales no creo hubiera llegado tan lejos. No me puedo olvidar de Mar, querida técnico cuya labor ha sido indispensable para este trabajo. Gracias a todos aquellos cuyo apoyo técnico me brindó la oportunidad de ampliar mis conocimientos como la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Fernández Criado, directora del animalario, y a sus técnicos por el cuidado de los animales de experimentación. A Esther secretaria del departamento por su ayuda en las tareas administrativas que no son pocas, y muy especialmente agradecerle a la Dra. Gloria Balfagón el que estuviera siempre a nuestra disposición.

Quiero agradecer a mis amigos de Palma a los que llevo en el corazón que aún estando lejos haya conseguido sentirles siempre tan cerca, a Raquel, Carol, Lilian y Maury por estar siempre en los buenos y malos momentos.

A Rodrigo compañero infatigable, gracias por creer en mi, por tu paciencia y por compartir tu vida conmigo.

Por último agradecer a la Dra. Mercedes Ferrer haberme brindado la posibilidad de pertenecer a su grupo de investigación, por dedicarme tantas horas para que este trabajo saliera adelante.



<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
I. Características generales de la pared arterial .....	8
I.a. Túnica Íntima .....	9
I.b. Túnica Media .....	10
I.c. Túnica Adventicia .....	10
<b>II. Contracción y relajación del músculo liso vascular .....</b>	<b>11</b>
<b>III. Modulación del tono vascular .....</b>	<b>14</b>
III.a. Oxido nítrico .....	14
III.b. Prostanoides .....	18
III.c. Especies reactivas de oxígeno.....	24
III.d. Otros factores vasoactivos.....	26
<b>IV. Hormonas sexuales .....</b>	<b>29</b>
IV.a. Características generales .....	29
Andrógenos .....	29
Estrógenos .....	31
IV.b. Relación de las hormonas con la función vascular .....	34
Andrógenos .....	34
Estrógenos .....	39
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
I. Animales de experimentación .....	46
II. Presión arterial.....	46
III. Niveles de hormonas en sangre.....	46
IV.Expresión de la COX-1/2 y eNOS.....	47
V. Liberación de prostanoides.....	49
VI. Liberación de NO .....	50
VII. Reactividad vascular .....	51
VIII. Soluciones y fármacos .....	54
IX. Análisis estadístico .....	54

<b>RESULTADOS y DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>Efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre:.....</b>	<b>56</b>
<b>I. Presión arterial, peso corporal y niveles de hormonas en sangre .....</b>	<b>56</b>
<b>II. Respuesta contráctil inducida por KCl y 5-HT.....</b>	<b>57</b>
<b>III. Respuesta vasodilatadora inducida por ACh.....</b>	<b>58</b>
III.a. Participación del NO endotelial.....	59
III.b. Participación de prostanoïdes .....	62
III.b1. Participación del TXA <sub>2</sub> en la respuesta inducida por la ACh.....	66
III.b2. Participación de PGI <sub>2</sub> en la respuesta inducida por la ACh.....	71
III.b3. Participación de la PGF <sub>2α</sub> en la respuesta inducida por la ACh .....	77
III.b4. Participación de la PGE <sub>2</sub> en la respuesta inducida por la ACh.....	79
<b>Efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre:.....</b>	<b>83</b>
<b>I. Presión arterial, peso corporal y niveles de hormonas en sangre.....</b>	<b>83</b>
<b>II. Respuesta contráctil inducida por KCl y 5-HT.....</b>	<b>83</b>
<b>III. Respuesta vasodilatadora inducida por ACh.....</b>	<b>85</b>
III.a. Participación del NO endotelial.....	86
III.b. Participación de prostanoïdes .....	90
III.b1. Participación del TXA <sub>2</sub> en la respuesta inducida por la ACh.....	93
III.b2. Participación de PGI <sub>2</sub> en la respuesta inducida por la ACh.....	97
III.b3. Participación de la PGF <sub>2α</sub> en la respuesta inducida por la ACh .....	104
III.b4. Participación de la PGE <sub>2</sub> en la respuesta inducida por la ACh.....	105
 <b>CONCLUSIONES .....</b>	 <b>111</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	 <b>113</b>



Se ha demostrado una relación entre los niveles de hormonas sexuales y aparición de enfermedades cardiovasculares. La incidencia de las mismas es menor en mujeres premenopáusicas que en hombres de la misma edad, igualándose en la menopausia. Por todo ello tradicionalmente se ha atribuido un efecto deletéreo a los andrógenos y un efecto protector a los estrógenos sobre el sistema cardiovascular. Sin embargo, recientemente el papel de los andrógenos en el sistema vascular está recibiendo considerable interés y existen evidencias experimentales y clínicas que indican que los andrógenos poseen efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular en machos, semejantes a los descritos para los estrógenos en hembras. Las células endoteliales producen derivados de las enzimas eNOS y COX que regulan el tono vascular. El metabolismo del ácido araquidónico a través de la activación de la COX produce prostanoïdes vasoconstrictores y vasodilatadores, se ha descrito que el NO modula la síntesis de los mismos, sin embargo la información del efecto de los prostanoïdes sobre la síntesis de NO es prácticamente inexistente.

En este sentido, hemos analizado en aorta de ratas macho y hembra la influencia de las hormonas sexuales endógenas sobre la participación del NO endotelial en la relajación inducida por ACh. Para ello usamos segmentos de aorta de Sprague-Dawley de machos (control y oquidectomizado) y hembras (en estro y ovariectomizadas). Puesto que no obtuvimos diferencias ni en la expresión de la eNOS ni en la liberación de NO, determinamos que la privación de hormonas sexuales no modifica la participación del NO endotelial ni en machos ni en hembras.

Nuestro siguiente objetivo fue analizar la participación de prostanoïdes en la relajación inducida por ACh, obtuvimos que la privación de hormonas sexuales produjo un incremento en la expresión de COX-2. Por tanto con el fin de determinar el posible papel funcional del TXA<sub>2</sub> en la vasorrelajación inducida por ACh, se incubaron algunos segmentos de ambos grupos de animales con furegrelato (inhibidor de la síntesis de TXA<sub>2</sub>) y con SQ29,548 (antagonista de los receptores TP). Para investigar el posible papel de la PGI<sub>2</sub> se incubaron algunos segmentos con tranilcypromine, TCP (inhibidor de la síntesis de PGI<sub>2</sub>). Para investigar las posibles interacciones entre TXA<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>

se realizaron curvas concentración respuesta a ACh, en presencia de TCP más furegrelato, o TCP más SQ29,548. El furegrelato incrementó la relajación a ACh solo en machos orquidectomizados y el SQ29,548 la disminuyó en hembras ovariectomizadas. El TCP disminuyó la respuesta a ACh en todos los grupos pero el efecto fue mayor en machos y hembras gonadectomizados. La incubación de TCP más furegrelato no revertió la disminución producida por TCP en ausencia de hormonas ni en machos ni en hembras, sin embargo esta respuesta se reinstauró mediante la coincubación de TCP más SQ29,548 sólo en machos orquidectomizados.

Por lo tanto el siguiente objetivo fue analizar el efecto vasomotor de los distintos prostanoïdes así como su liberación inducida por ACh. Así pues observamos que la gonadectomía incrementó en la liberación de TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> en machos y en hembras; e incrementó la PGF<sub>2α</sub> sólo en machos. Respecto a su efecto vasomotor, la gonadectomía disminuyó el efecto vasodilatador de PGI<sub>2</sub> tanto en machos como en hembras, e incrementó el efecto vasoconstrictor del TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> en hembras y sólo el de PGE<sub>2</sub> en machos.

Por último y puesto que, como ya hemos indicado, los estudios del efecto de los prostanoïdes sobre el NO son escasos, decidimos determinar si los protanoïdes modulan de alguna manera la liberación de NO. Para ello medimos la liberación del mismo en presencia de los distintos inhibidores de la síntesis de prostanoïdes. Se observó que la liberación de NO en ausencia de hormonas sexuales está regulada positivamente sólo por el TXA<sub>2</sub> en aorta de ratas macho, y que la liberación de NO en ratas hembra está regulada positivamente por TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y demás prostanoïdes derivados de COX-2.

En resumen, este estudio comparativo sobre la influencia de las hormonas sexuales endógenas en machos y en hembras sobre la liberación/función de prostanoïdes y NO endotelial nos provee de un argumento más a favor del papel cardioprotector de las hormonas sexuales endógenas en los dos sexos. A la vez pone de manifiesto la existencia de distintas vías de señalización que actúan simultáneamente para mantener una función vascular adecuada.





<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b> : Concentración intracelular de Ca <sup>2+</sup>	<b>IP<sub>3</sub></b> : Inositol-1,4,5-trifosfato
<b>5-HT</b> : 5-hidroxitriptamina	<b>K<sub>ATP</sub></b> : Canales de K <sup>+</sup> dependientes de ATP
<b>AA</b> : Ácido araquidónico	<b>K<sub>Ca</sub></b> : Canales de K <sup>+</sup> dependientes de calcio
<b>AC</b> : Adenilato Ciclasa	<b>KHS</b> : Krebs-Henseleit
<b>ACh</b> : Acetilcolina	<b>L-NAME</b> : N <sup>o</sup> -nitro-L-arginina metil éster
<b>AMP</b> : Adenosín monofosfato	<b>MLCK</b> : Quinasa de la cadena ligera de miosina
<b>AMPc</b> : Adenosín monofosfato cíclico	<b>NA</b> : Noradrenalina
<b>Ang II</b> : Angiotensina II	<b>NADPH</b> : Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
<b>ATP</b> : Adenosín trifosfato	<b>nNOS</b> : Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup></b> : Bomba de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> dependiente de ATP	<b>NO</b> : Óxido nítrico
<b>BH<sub>4</sub></b> : Tetrahidrobiopterina	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> : Aniones superóxido
<b>CaM</b> : Calmodulina	<b>PG</b> : Prostaglandina
<b>COX</b> : Ciclooxigenasa	<b>PGE<sub>2</sub></b> : Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>DAG</b> : Diacilglicerol	<b>PGF<sub>2α</sub></b> : Prostaglandina F <sub>2α</sub>
<b>DHT</b> : Dihidrotestosterona	<b>PGH<sub>2</sub></b> : Prostaglandina H <sub>2</sub>
<b>EDHF</b> : Factor hiperpolarizante derivado del endotelio	<b>PGI<sub>2</sub></b> : Prostaglandina I <sub>2</sub> , prostaciclina
<b>EDRF</b> : Factor relajante derivado del endotelio	<b>PIP<sub>2</sub></b> : Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
<b>EEM</b> : Error estándar de la media	<b>PKA</b> : Proteína quinasa A
<b>eNOS</b> : Óxido nítrico sintasa endotelial	<b>PKC</b> : Proteína quinasa C
<b>ET</b> : Endotelina	<b>PKG</b> : Proteína quinasa G
<b>FAD</b> : Flavín-adenín-dinucleótido	<b>PLC</b> : Fosfolipasa C
<b>FMN</b> : Flavín-mononucleótido	<b>ROS</b> : Especies reactivas de oxígeno
<b>GC</b> : Guanilato ciclasa	<b>SNP</b> : Nitroprusiato sódico
<b>GMP</b> : Guanosín monofosfato	<b>SOD</b> : Superóxido dismutasa
<b>GMPc</b> : Guanosín monofosfato cíclico	<b>TXA<sub>2</sub></b> : Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>iNOS</b> : Óxido nítrico sintasa inducible	

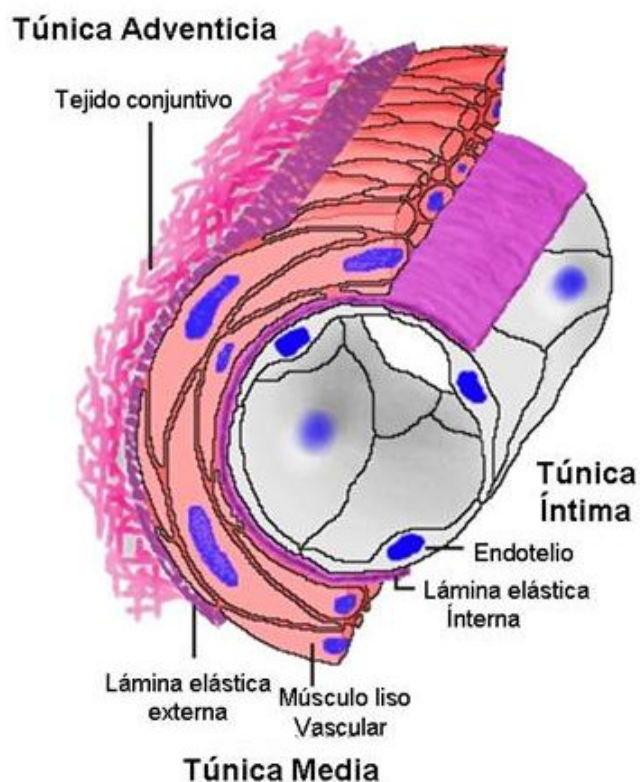
# **Introducción**

## I. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA PARED ARTERIAL.

El sistema circulatorio está formado por vasos que transportan la sangre, y con ella los nutrientes y el oxígeno, hacia los tejidos. Las diferentes células que componen la pared vascular, mediante la liberación de diferentes factores vasoactivos, contribuyen a mantener la homeostasis vascular en respuesta a múltiples estímulos, regulando la actividad contráctil, mitogénica y trombótica de la pared vascular.

En la organización básica de la pared vascular se pueden distinguir tres capas concéntricas: (1) la más interna, túnica íntima, constituida por células endoteliales; (2) una capa media formada mayoritariamente por fibras musculares; y (3) una tercera capa o túnica adventicia integrada por fibras de colágeno, fibroblastos y algunas fibras elásticas y musculares dispersas.

La túnica íntima y la media están separadas por la lámina elástica interna, mientras que la media y la adventicia lo están por la lámina elástica externa (Rhodin, 1980) (fig.1).



**Figura 1:** Estructura general de la pared arterial (adaptado de <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140>).

## I.a. Túnica Íntima

Es la capa más interna de la pared arterial y está constituida por un epitelio simple y plano de células (Simionescu, 1983) orientadas longitudinalmente y unidas estrechamente (Rhodin, 1980), una lamina basal y tejido conjuntivo subendotelial laxo. Las células endoteliales no sólo constituyen una barrera mecánica entre la sangre y la pared vascular sino que además son uno de los principales órganos de regulación vascular a través de la producción y liberación de sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras (Cooke y Dzau, 1997). Su posición anatómica permite actuar como receptor y transmisor de señales entre la sangre y la pared vascular (Lüscher y Vanhoutte, 1990). Posee acciones exocrina, paracrina y autocrina, y está implicado en: la liberación de agentes vasoactivos, la respuesta inmune, el control de la proliferación del músculo liso subyacente y en la adhesión y extravasación de los leucocitos (Lüscher y Vanhoutte, 1990). En respuesta a distintos estímulos, el endotelio es capaz de liberar distintos agentes (tabla1).

<b>Factores liberados por el endotelio</b>	
<b>Factores vasoactivos</b>	
<b>Vasodilatadores</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Óxido nítrico (NO)</li> <li>- Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)</li> <li>- Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)</li> </ul>
<b>Vasoconstrictores</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Endotelina 1 (ET-1)</li> <li>- Angiotensina II (Ang II)</li> <li>- Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)</li> </ul>
<b>Moduladores del crecimiento</b>	
<b>Promotores del crecimiento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)</li> <li>- Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)</li> <li>- Somatomedina 1 (IGF-1)</li> <li>- Endotelina 1 (ET-1)</li> <li>- Angiotensina II (Ang II)</li> </ul>
<b>Inhibidores del crecimiento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sulfato de heparano (HPS)</li> <li>- Factor de crecimiento transformante (TGF)</li> <li>- Óxido nítrico (NO)</li> <li>- Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)</li> </ul>
<b>Moduladores de la inflamación</b>	
<b>Moléculas de adhesión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Molécula de adhesión leucocito endotelial (ELAM)</li> <li>- Molécula de adhesión intracelular (ICAM)</li> <li>- Molécula de adhesión vascular (VCAM)</li> </ul>
<b>Factores hemostáticos y trombolíticos</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activador del plasminógeno tisular (t-PA)</li> <li>- Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1)</li> <li>- Trombomodulina</li> </ul>

**Tabla 1.** Factores liberados por el endotelio vascular (Lahera y col., 1998).

La acción combinada de estos factores mantiene la homeostasis vascular y garantiza el flujo sanguíneo adecuado a los correspondientes órganos. Por eso numerosas patologías cardiovasculares como la arteriosclerosis, la hipertensión arterial, la sepsis, la trombosis, la vasculitis, hemorragias, etc. cursan con disfunción endotelial (Lahera y col., 1999).

### **I.b. Túnica Media**

Es la capa intermedia de la pared vascular formada por capas concéntricas de células musculares lisas entre las cuales se interponen cantidades variables de elastina, fibras reticulares y proteoglicanos, que en las arterias está bastante más desarrollada que en las venas, y que prácticamente no existe en los capilares. Las fibras musculares lisas de la túnica media son las responsables del mantenimiento de la tensión muscular, por la regulación del diámetro de la luz del vaso siendo capaces de contraerse y relajarse en respuesta a diferentes estímulos. A diferencia del músculo esquelético y cardíaco, el músculo liso vascular es capaz de mantener una fuerza tónica durante largos periodos de tiempo y con un bajo coste energético. La matriz extracelular, cuyos componentes proteicos más importantes son la elastina y el colágeno, determina la distensibilidad de la arteria (Rhodin, 1980).

### **I.c. Túnica Adventicia**

Es la capa externa compuesta por tejido conjuntivo con abundantes fibras de colágeno tipo I, fibroblastos y fibras elásticas, tejido adiposo, *vasa vasorum* y terminaciones nerviosas que liberan distintos neurotransmisores (Li y Duckles, 1992; Marín y Balfagón, 1998). Así, los neurotransmisores liberados van a ejercer su acción sobre los distintos tipos celulares que componen la pared vascular a través de la unión con sus receptores postsinápticos. Este tipo de regulación tendrá mayor o menor importancia dependiendo del grado de inervación de la arteria, siendo especialmente relevante en los vasos de pequeño calibre (tabla 2).

INERVACIÓN	NEUROTRANSMISOR	RECEPTOR	LOCALIZACIÓN	EFEECTO
ADRENÉRGICA	Noradrenalina	$\alpha$ -adrenérgicos $\beta$ -adrenérgicos	Células endoteliales y musculares	Vasoconstricción Vasodilatación
COLINÉRGICA	Acetilcolina	Muscarínicos $M_1$ - $M_5$	Células endoteliales y musculares	Vasodilatación Vasoconstricción
NITRÉRGICA	Óxido nítrico	Difunde de las neuronas al músculo liso		Vasodilatación
SEROTONINÉRGICA	Serotonina	$5\text{-HT}_1$ - $5\text{-HT}_7$	Músculo liso y endotelio	Vasoconstricción
PEPTIDÉRGICA	Péptido vasointestinal Neuropéptido Y CGRP Sustancia P	VPAC $Y_1$ - $Y_5$ RAMP/CRLR NK1	Músculo liso y endotelio	Vasoconstricción Vasodilatación
PURINÉRGICA	ATP	$P_1$ - $P_2$	Músculo liso y endotelio	Vasodilatación

**Tabla 2.** Regulación nerviosa vascular. Efecto de los distintos neurotransmisores liberados desde sus correspondientes terminaciones nerviosas.

En el tejido adiposo blanco perivascular se forman leptinas y factor relajante derivado de adipocitos (ADRF) que inducen vasodilatación (Fortuno y col., 2002).

Adicionalmente, se producen radicales libres de oxígeno, como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que afectan tanto a la función del músculo liso como a la de las células endoteliales, regulando de esta manera también el tono vascular (Pagano y col., 1995).

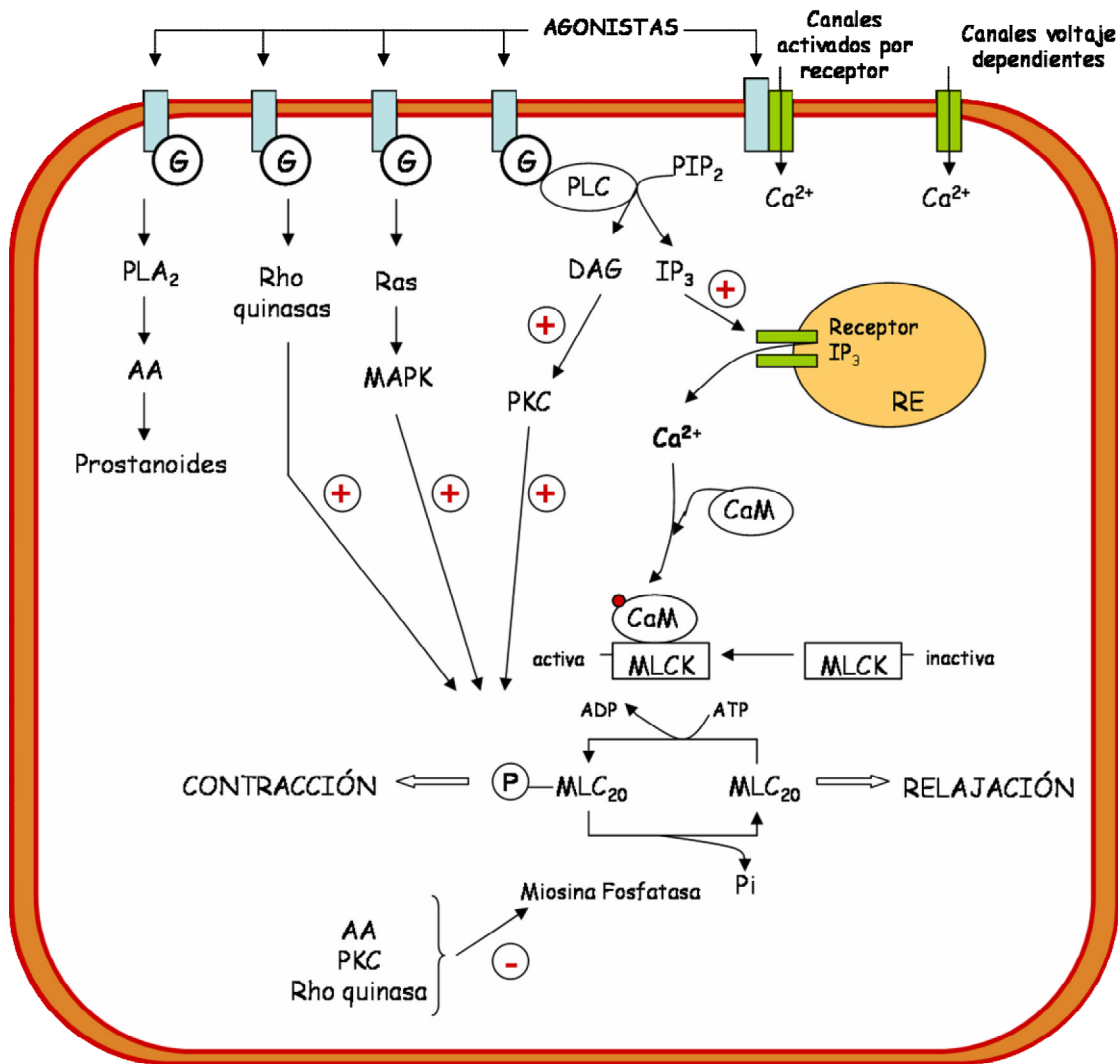
## II. CONTRACCIÓN Y RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR.

Las células musculares son células fusiformes de núcleo alargado que contienen haces de actina y miosina, responsables de la **contracción**, por el desplazamiento de los filamentos de actina sobre los de miosina. En la contracción del músculo liso vascular se pueden distinguir dos componentes, una contracción fásica y una contracción tónica (Rasmussen y col., 1987). La primera, se caracteriza por una respuesta rápida y transitoria,

modulada por el sistema  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (Dillon y col., 1981), mientras que la segunda se regula por la caldesmosina (Smith y col., 1987), una proteína contráctil asociada al dominio actina-miosina.

La contracción se inicia al incrementarse la concentración intracelular de calcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), y unirse a la calmodulina; el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina cataliza la fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina (MLC) al combinarse con la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) que se encuentra inactiva formando un complejo enzimático que cataliza la transferencia de grupos fosfato a la cadena ligera de la miosina ( $\text{MLC}_{20}$ ), incrementando así la actividad ATPasa de la miosina (Gao y col., 2001) lo que permite la formación de puentes cruzados en la miosina y la interacción de éstos con los filamentos de actina y provocar la contracción. La energía para la contracción proviene del adenosín trifosfato (ATP) (Alberts y col., 1992).

El incremento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser debido a la estimulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular por la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, que se activan por despolarización de la membrana, y/o por canales de  $\text{Ca}^{2+}$  acoplados a receptor (Horowitz y cols., 1996); también los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico contribuyen a la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Broekaert y Godfraind, 1979). La unión de un ligando con su receptor específico daría lugar a la activación de una proteína G y la subsiguiente activación de la fosfolipasa C (PLC), ambas en la membrana plasmática. La PLC cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), en diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). El DAG estimula la proteína quinasa C (PKC), ejerciendo un papel relevante en la fosforilación de la MLC, y manteniendo así la contracción muscular (Salamanca y Khalil, 2005). Por otra parte el  $\text{IP}_3$  promueve la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo endoplásmico por activación del receptor- $\text{IP}_3$  de la membrana del retículo. La activación de proteínas G acopladas a receptores, no sólo estimula la PLC, sino que también puede activar la fosfolipasa  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) y la biosíntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (AA); además, puede activar Rho-quinasas y de proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK-Ras). La PKC, Rho-quinasa y MAPK pueden fosforilar directamente la  $\text{MLC}_{20}$ , incrementando la actividad ATPasa de la miosina. Además el AA, la PKC y la Rho-quinasa inhiben a la enzima miosina fosfatasa, manteniendo de esa forma la fosforilación de la  $\text{MLC}_{20}$  (Abdel-Latif, 2001) (fig.2).



**Figura 2:** Mecanismos intracelulares implicados en la contracción del músculo liso.

Las respuestas del músculo liso vascular a algunos agonistas como la noradrenalina (NA), angiotensina II (Ang-II), serotonina (5-HT), etc. tienen lugar a través de la vía del  $\text{PIP}_2$  tras interactuar con los receptores específicos correspondientes.

Asimismo, la **relajación** muscular, que provoca un aumento del diámetro de la luz, tiene lugar cuando disminuye la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . En estas ocasiones, la calmodulina se disocia de la MLCK, inactivándola y los grupos fosfatos son eliminados posteriormente por la fosfatasa de la miosina. Existen receptores de membrana en las células musculares lisas para multitud de agentes vasoactivos que activan, inhiben o modulan dicho comportamiento. Existen sustancias que inducen relajación independiente de endotelio, activando canales de  $\text{K}^+$  localizados en las células musculares y produciendo hiperpolarización (Klockgether-Radke y col., 2004), o incrementando la formación de segundos mensajeros como adenosín



monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc) (Eckly y col., 1994) (fig.2). Adicionalmente, la activación de distintos receptores localizados en células endoteliales induce la producción de factores vasoactivos que ejercen su acción sobre las células musculares lisas modulando el tono vascular.

### **III. MODULACIÓN DEL TONO VASCULAR.**

El endotelio vascular actualmente es considerado un receptor de estímulos físicos y químicos que responde liberando diferentes agentes vasoactivos, que influyen en el crecimiento y proliferación de las células de la pared vascular, contribuyendo a la regulación del tono vascular.

Actualmente se sabe que las células endoteliales son sensibles a cambios hemodinámicos, como la presión o las fuerzas de cizallamiento, a mensajeros químicos circulantes o procedentes de células vecinas, que interaccionan con diferentes células y responden a estos estímulos mediante la liberación de numerosos factores vasoactivos (Lüscher y Vanhoutte, 1990). El equilibrio que resulta de la acción de los factores endoteliales inductores de vasoconstricción y proliferación celular (Ang-II, endotelina (ET), tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), aniones superóxido, etc.) y los factores inductores de vasodilatación y “antiproliferación” (óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), factor hiperpolarizante (EDHF), etc.) es esencial para la homeostasis vascular (tabla 1).

#### **III.a. Óxido Nítrico (NO)**

Furchgott y Zawadzki descubrieron, en aorta de conejo, la existencia de un factor derivado del endotelio inducido por acetilcolina (ACh), que producía la relajación de dicha arteria (Furchgott y Zawadzki, 1980).

A esta sustancia o al conjunto de sustancias vasodilatadoras producidas por el endotelio se les denominó EDRF (factor relajante derivado del endotelio). Posteriormente, Ignarro y col. (1987), Palmer y col. (1987) y Furchgott (1988), de manera independiente, demostraron que las acciones fisiológicas y farmacológicas del EDRF podrían ser atribuidas al NO. Actualmente, se sabe que el NO es uno de los principales mediadores celulares endógenos,

ya que presenta propiedades vasodilatadoras, antiagregantes y antiproliferativas (Hampl y Herget, 2000).

El NO es un gas que atraviesa las membranas celulares y difunde a las células adyacentes. Como además es un radical libre muy inestable que reacciona rápidamente con el oxígeno para formar nitrito, tiene una vida media muy corta, del orden de unos pocos segundos, lo que condiciona que su función como mediador de comunicación intercelular sea de tipo paracrino y autocrino.

La síntesis de NO es llevada a cabo por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Moncada y Higgs, 1991), de la cual existen dos isoformas constitutivas denominadas eNOS o endotelial presente principalmente en las células endoteliales (Pollock y col., 1992) y nNOS o neuronal presente principalmente en neuronas (Bredt y col., 1990), que son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y de calmodulina. Además, existe otra isoforma inducible denominada iNOS presente en distintos tipos celulares (Pollock y col., 1995), que es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y de calmodulina.

#### *- regulación de eNOS*

eNOS, está presente en células vasculares endoteliales (Alderton y col, 2001), unida específicamente a membranas en las caveolas (Michel y Feron, 1997). Su actividad es muy sensible a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , que es considerado como el estímulo más importante de la actividad de la eNOS. Así, sustancias vasoactivas dependientes de endotelio, como es el caso de la ACh, que se une a receptores de membrana acoplados a proteína G u otros estímulos que proporcionan también el incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  activarían la eNOS (Schulz y col., 1992). Pero existen otros mecanismos adicionales que regulan la actividad de la eNOS como los procesos de fosforilación y desfosforilación de distintos aminoácidos (Govers y Rabelink, 2001).

#### *- regulación de la nNOS*

nNOS, enzima citosólica dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , presente principalmente en el sistema nervioso central y periférico (Alderton y col, 2001), cataliza la liberación de NO que desempeña el papel de neurotransmisor (Wiklund y col., 1997). Se ha descrito la existencia de NO en terminaciones nerviosas que rodean distintos lechos vasculares como en la arteria

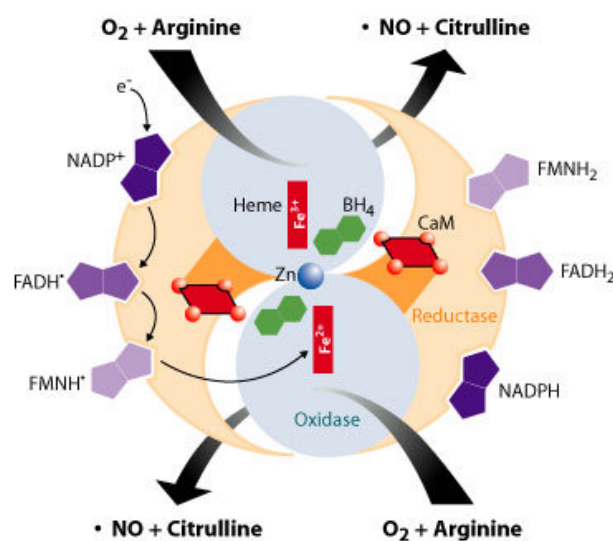
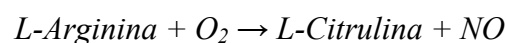
mesentérica (Yoshida y col., 1994; Marín y Balfagón, 1998) y cuya liberación participa también en la modulación del tono vascular.

#### - regulación de la iNOS

iNOS, enzima que puede expresarse en procesos inflamatorios en macrófagos y células musculares lisas. Su activación requiere los mismos cofactores que la eNOS y nNOS, con la diferencia de que, puede actuar a concentraciones de calcio más bajas que las anteriores isoformas (Hobbs y col., 1999). Aunque es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  contiene un sitio de unión específico a la calmodulina, diversas citoquinas y endotoxinas que mediante la activación de distintos factores nucleares como NF- $\kappa\beta$ , son capaces de estimular la síntesis *de novo* de la enzima (Sheehan y col., 2002). En situaciones patológicas se libera grandes cantidades de NO a partir de células endoteliales (Radomski y col., 1990) y del músculo liso (Fleming y col., 1991).

Dichas isoformas contienen FMN (flavín mononucleótido), FAD (flavín adenina dinucleótido), calmodulina, grupo hemo y tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) como grupos prostéticos (Bredt y col., 1990) (fig.3).

La producción de NO, proviene de la oxidación enzimática de cinco electrones de un N-guanidino del aminoácido L-arginina, por la acción de la NO sintasa (NOS), utilizando como donador de electrones el nucleótido NADPH (Palmer y Moncada, 1989):



**Figura 3:** Dominios catalíticos de la óxido nítrico sintasa.

La enzima puede ser inhibida por competición de análogos de la L-arginina como N<sup>o</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA) o N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME).

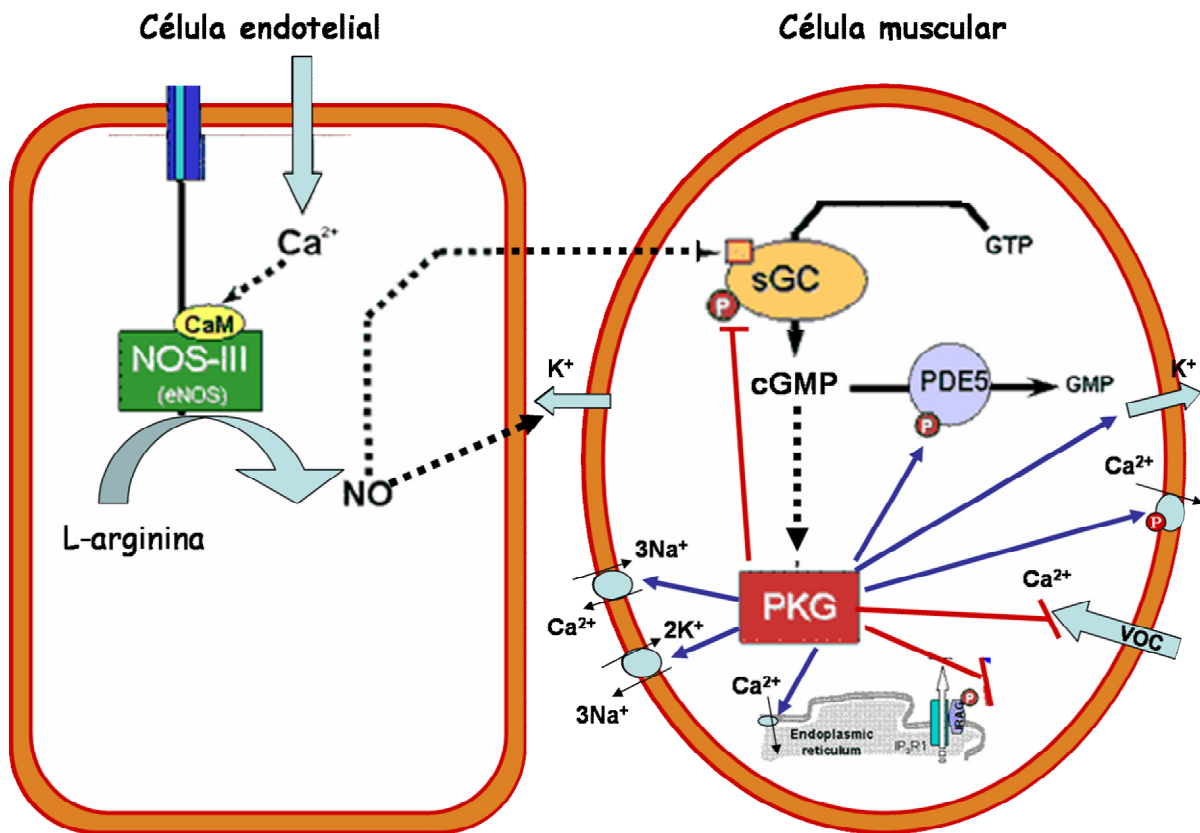
#### *Mecanismo de acción del NO*

El NO liberado por el endotelio difunde fácilmente a las células musculares adyacentes, dónde produce vasodilatación mediada por el incremento del GMPc (Ignarro y Kadowitz, 1985). El GMPc se produce a partir del guanosín trifosfato (GTP), gracias a la activación de la guanilato ciclasa (GC) debido a la unión covalente, de alta afinidad, del grupo hemo con NO.

El GMPc, activa la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) que, mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina puede activar o inhibir la función de distintas proteínas que en conjunto disminuyen la  $[Ca^{2+}]_i$  y producen la relajación de la fibra (fig.4) a través de distintos mecanismos:

- a) Activación de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplasmático introduciendo  $Ca^{2+}$  al interior del retículo (Cohen y col., 1999).
- b) La regulación en la fosforilación y activación de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática, liberando  $Ca^{2+}$  al exterior de la célula (Barnes y Liu, 1995).
- c) Cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje de la membrana plasmática (Ruiz-Velasco y col., 1998).
- d) Inhibición de la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo inducida por  $IP_3$  inhibiendo sus receptores mediante fosforilación (Hirata y col., 1990).
- e) Activación de la ATPasa  $Na^+/K^+$  (Rapoport y col., 1985).
- f) Activación de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  (Robertson y col., 1993).
- g) Estimulación del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (Furukawa y col., 1991).

Asimismo el NO también puede producir hiperpolarización del músculo liso vascular mediante la activación directa de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  (Bolotina y col., 1994).



**Figura 4:** Esquema de los mecanismos que participan en la vasodilatación inducida por el NO/GMPc.

Tradicionalmente, se ha descrito que el GMPc induce relajación por mecanismos independientes de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  intracelular y relacionados con una reducción directa de la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  del aparato contráctil e impidiendo la fosforilación de la miosina (McDaniel y col., 1992).

### III.b. Prostanoides

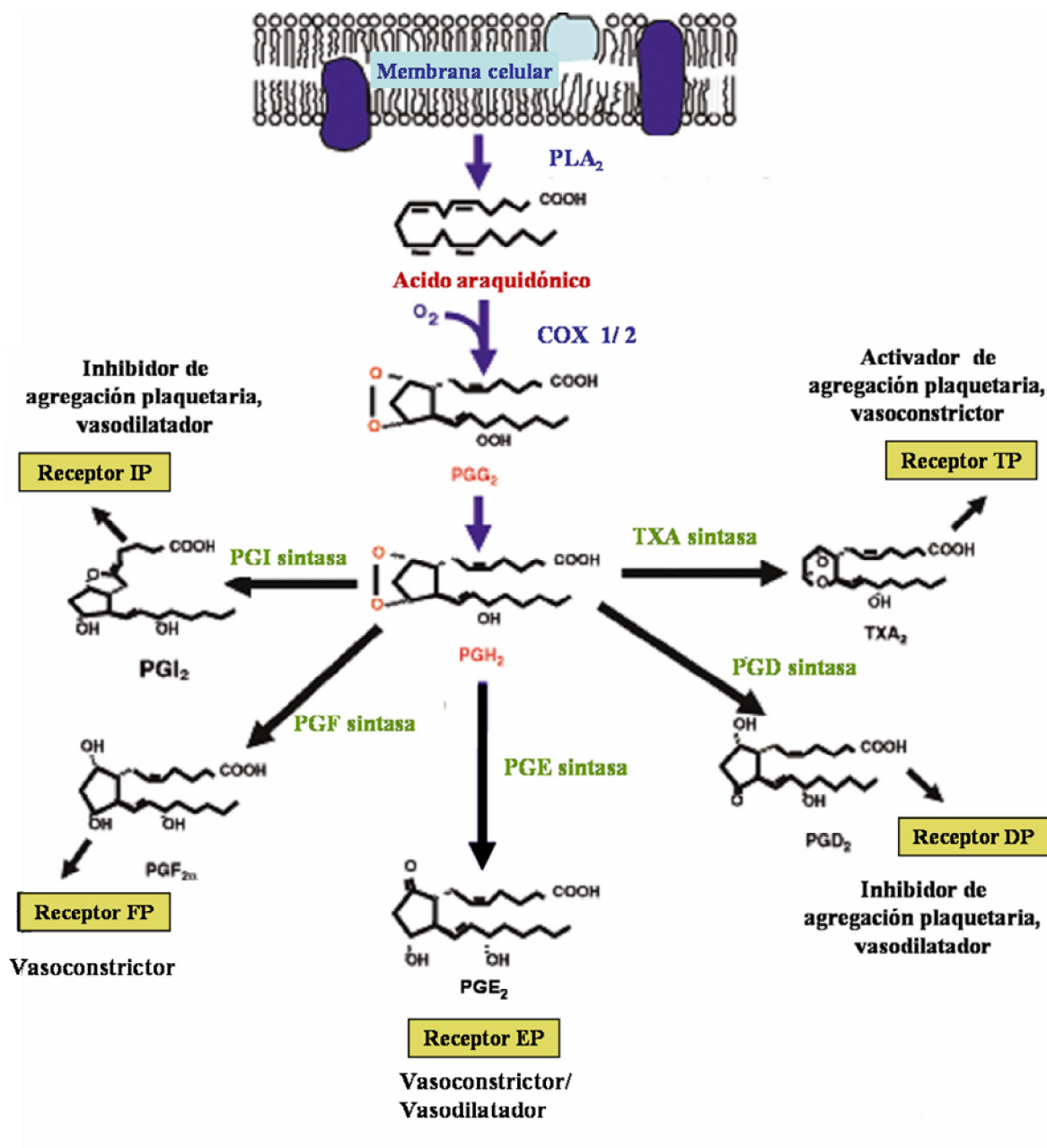
Los prostanoides son mediadores celulares sintetizados a partir del ácido araquidónico (AA) por activación de la ciclooxigenasa (COX) (Vane y col., 1998) (fig.5).

Actualmente se sabe que existen dos isoformas de la enzima COX (COX-1 y COX-2) que están codificadas por distintos genes y se encuentran asociadas a la cara luminal del retículo endoplásmico y a la membrana nuclear (Romano y Claria, 2003; Trifan y Hla, 2003). Ambas poseen una estructura tridimensional similar y que se encuentran orientadas de tal forma que metabolizan instantáneamente el AA liberado (Morita y col., 1995):

La **COX-1** se expresa de forma constitutiva en multitud de tejidos y células del organismo (O'Neill y col., 1994) y aunque la expresión de COX-1 es constitutiva en la mayoría de tejidos, se ha descrito la expresión inducible del gen de COX-1 en varios tipos celulares, bajo diferentes estímulos (Tanabe y Tohnai, 2002; Ramsay y cols., 2003). Interviene en la producción de prostaglandinas (PG) que regulan distintas funciones fisiológicas, como la activación o agregación plaquetaria y la función renal (Merlie y col., 1988; Funk y col., 1991).

La **COX-2** se expresa en numerosos tipos celulares en respuesta a estímulos inflamatorios como LPS o citoquinas como la IL-1 $\beta$ ; sin embargo, se ha demostrado también que se expresa constitutivamente en determinadas zonas del cerebro y del riñón (Vane y col., 1998) y vasos sanguíneos. La COX-2 se expresa en células endoteliales, musculares lisas y fibroblastos, su actividad y expresión está modulada por diferentes estímulos mitogénicos y proinflamatorios (Briones y col., 2005; Kulmacz y Wang, 1995).

La COX posee dos actividades catalíticas, una ciclooxigenasa, que incorpora dos moléculas de O<sub>2</sub> al AA formando PGG<sub>2</sub>, y otra peroxidasa, que cataliza la reducción de PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> (Davidge, 2001). Los prostanoïdes bioactivos PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  y PGD<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> se forman por acción de sus correspondientes sintasas y actúan de manera autocrina y paracrina, activando sus receptores específicos produciendo efectos frecuentemente opuestos dentro de una misma célula (fig.5). La activación de estos receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas modula el nivel intracelular de segundos mensajeros como AMPc o IP<sub>3</sub>.



**Figura 5:** Formación de distintos prostanoideos a partir del ácido araquidónico por la acción de COX-1/2. Se indican los efectos vasomotores que producen a través de la activación de sus receptores específicos (IP, TP, DP, EP y FP).

#### -Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)

En los vasos sanguíneos, la PGI<sub>2</sub> sintasa es la responsable de la producción de PGI<sub>2</sub> (Vane y col., 1998), vasodilatadora y antiagregante (Higgs y Moncada, 1983), ésta es muy inestable y se degrada espontáneamente en su metabolito estable 6-keto-PGF<sub>1α</sub>. La PGI<sub>2</sub> a

bajas concentraciones activa su receptor específico IP y produce efecto vasodilatador (Williams y col., 1994) al reducir la  $[Ca^{2+}]_i$  en las células musculares por acción de AMPc

tras la activación de la adenilato ciclasa (AC). El AMPc induce la fosforilación de la proteína quinasa A (PKA) que causa la inhibición de los procesos contráctiles dependientes de  $Ca^{2+}$ -calmodulina (Hathaway y col., 1981) inhibiendo la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo por fosforilación del receptor del  $IP_3$ . La  $PGI_2$  también produce vasodilatación al activar sus receptores específicos IP (Adie y col., 1992) localizados en las células endoteliales en las que induce la liberación de NO (Ray y Marshall, 2006). Los receptores IP, que normalmente activan las proteínas  $G_s$ , pueden activar también las proteínas  $G_q$  y  $G_i$  dependiendo del tipo celular (Schwaner y col., 1995) produciendo vasoconstricción (fig.6). A concentraciones elevadas, la  $PGI_2$  puede activar los receptores TP y producir vasoconstricción (Blanco-Rivero y col., 2005b). La  $PGI_2$  tiene un papel cardioprotector importante en relación con aterogénesis y la enfermedad cardíaca pues entre otros efectos disminuye la síntesis de colesterol y reduce la actividad de los receptores LDL en leucocitos (Krone y col., 1988) y promueve hidrólisis de los ésteres de colesterol (Morishita y col., 1990). También se ha descrito que, análogos de la  $PGI_2$  inhiben la progresión de la aterosclerosis en aorta de hamsters (Kowala y col., 1993) y conejos (Braun y col., 1993). Los principales factores que estimulan la síntesis y liberación de  $PGI_2$  son la A-II, la ACh o la Bk (bradikinina), y productos liberados de las plaquetas como la 5-HT, la interleuquina-1 y el PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) (Mitchell y col., 1992). También se ha descrito que el NO (Mollace y col., 2005), especies reactivas de oxígeno (Bachschmid y col., 2005) y los propios prostanoides (Catella-Lawson y Crofford, 2001; Mukherjee y col., 2001) están regulando la síntesis de  $PGI_2$ , mostrando la interacción entre distintos mediadores celulares.

#### - *Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)*

El  $TXA_2$  es el resultado de la transformación del derivado del AA, la  $PGH_2$ , por la acción de la enzima  $TXA_2$  sintasa. Se ha descrito que el  $TXA_2$  es uno de los prostanoides vasoconstrictores más importantes producidos por la pared vascular, actúa estimulando la agregación plaquetaria, la contracción de las células musculares (Buzzard y col., 1993) y



regulando procesos de migración de las células endoteliales, angiogénesis y metástasis de tumores (Nie y col., 2000).

Se ha descrito que tanto las células endoteliales (Buzzard y col., 1993; Srisawat y col., 2003) como las musculares lisas (Gonzales y col., 2005; Blanco-Rivero y col., 2006a) sintetizan TXA<sub>2</sub>. La síntesis de TXA<sub>2</sub> se ve incrementada en una variedad de alteraciones cardiovasculares, en las cuales se ve implicado como un importante mediador celular (Fitzgerald y col., 1987). Participa en la disfunción endotelial asociada a diferentes factores de riesgo cardiovasculares como la diabetes e hipertensión (Shimokawa, 1998; Matz y col., 2000). La inhibición de su síntesis por aspirina ha sido asociada con el descenso de mortalidad causado por enfermedades cardiovasculares (Fitzgerald y col., 1987).

El TXA<sub>2</sub> ejerce sus acciones a través de su receptor específico, denominado TP, del cual se conocen dos isoformas distintas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ , que se distinguen en el extremo carboxi-terminal localizado en el interior de la célula. El hecho de que existan estas isoformas explica las múltiples vías de transducción de señales activadas por este receptor a través de distintas proteínas G (Narumiya y col., 1999) (fig.6). Así pues, al unirse el TXA<sub>2</sub> a su receptor TP y activar G<sub>q</sub> induce la vasoconstricción del músculo liso vascular al aumentar los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (Mayeux y col., 1989) y activar la PKC; a su vez la PKC activaría la serin/treonin quinasa c-Raf que desencadenará la vía de señalización de ERK1/2 (Hagemann y Rapp, 1999). También se ha descrito que la activación de los receptores TP pueden estar acoplados a proteínas G<sub>s</sub> que, mediante el incremento de AMPc, son capaces de activar las ERK en este caso parcialmente dependientes de PKA (Miggin y Kinsella, 2002).

La liberación de TXA<sub>2</sub> y otras PGs vasoconstrictoras puede ser estimulada por distintos agentes vasoconstrictores como la ET, la 5-HT, la NA y la A-II, así como por agentes vasodilatadores como la ACh o por acciones mecánicas sobre las células endoteliales (Manabí y col., 1989; Taddei y Vanhoutte, 1993).

- *Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)*

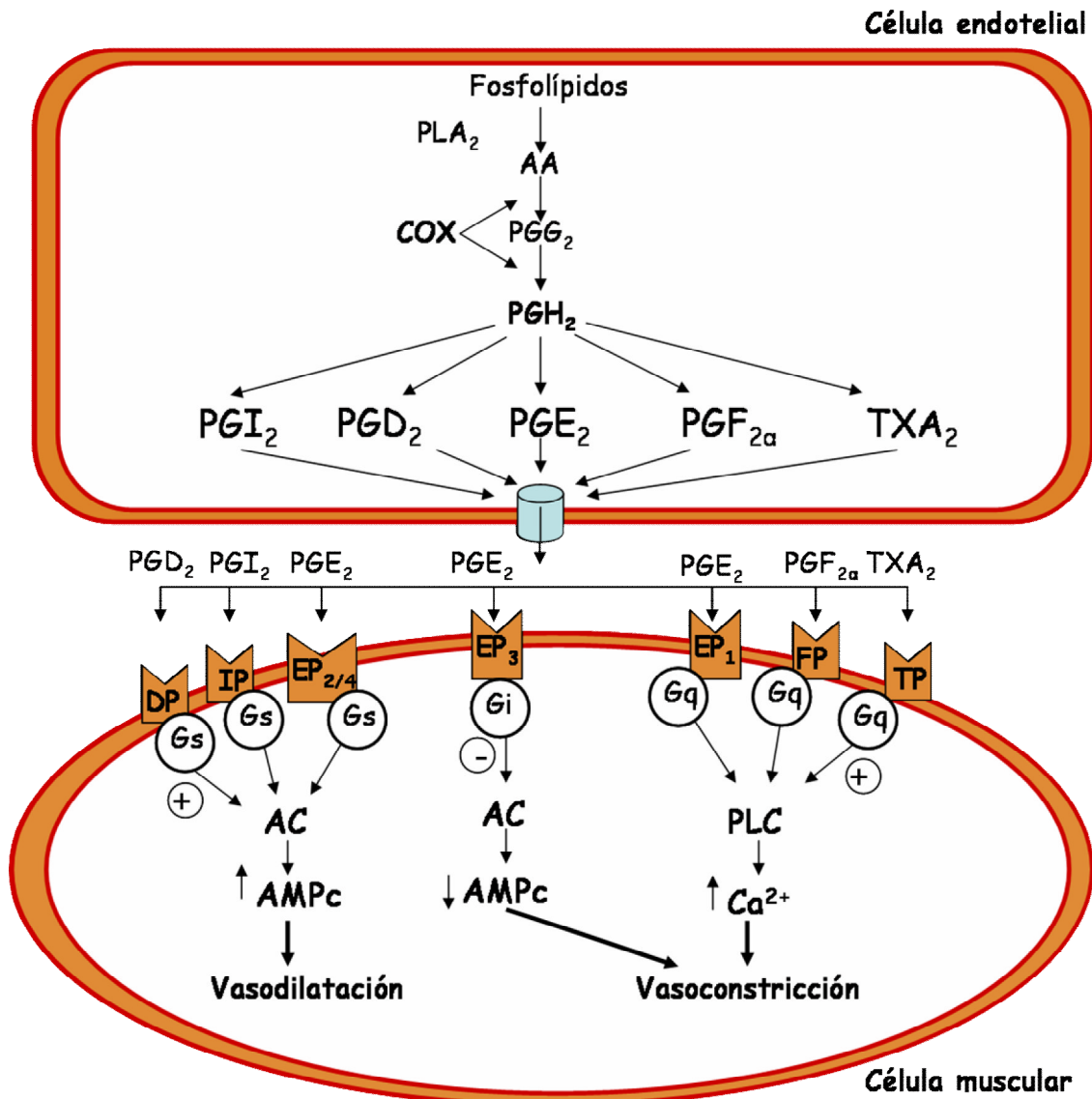
La PGE<sub>2</sub> es el resultado de la transformación del derivado del AA, la PGH<sub>2</sub>, por la acción de la enzima PGE sintasa, la cual posee dos isoformas una microsomal (mPGES) que a menudo está acoplada a COX-2 para retrasar o sostener la producción de PGE<sub>2</sub> (Murakami y col., 2000) y una citosólica (cPGES) que se encontró acoplada a COX-1 para la producción inmediata de PGE<sub>2</sub> (Tanioka y col., 2000).

Es un prostanoide que ejerce su efecto sobre sus receptores específicos EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> y EP<sub>4</sub>. El receptor EP<sub>1</sub> posee efecto contráctil y actúa activando la proteína G<sub>q</sub> aumentando así la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> e influyendo en el recambio del fosfatidilinositol (Funk y col., 1993). El receptor EP<sub>3</sub> disminuye la concentración de AMPc vía proteína G<sub>i</sub> produciendo vasoconstricción. Algunos estudios relacionan la activación de este receptor en el SNC con la respuesta febril (Coleman y col., 1994). La activación de los receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> producen efecto vasodilatador y antiagregante activando la proteína G<sub>s</sub>, que estimula la producción de cAMP por la AC (Coleman y col., 1994) (fig.6).

Adicionalmente la PGE<sub>2</sub> también puede actuar sobre los receptores TP (Gluais y col., 2006; Bos y col., 2004) y producir vasoconstricción.

- *Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>)*

La hipoxia (Arnould y col., 2001) y el estrés oxidativo elevado (Mervaala y col., 2001) aumentan la producción de PGF<sub>2α</sub> y su transformación a isoprostanos, que además de participar en la regulación del tono vascular ejercen un efecto hipertrófico sobre las células musculares lisas (Dorn y col., 1992; Yura y col., 1999). La PGF<sub>2α</sub> se produce por la acción de la PGF<sub>2α</sub> sintasa sobre la PGH<sub>2</sub>, se sintetiza en el endotelio y actúa directamente sobre el músculo liso vascular incrementando la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Murata y col., 1993) o activando canales de Cl<sup>-</sup> (Jiang y col., 2003). Adicionalmente la PGF<sub>2α</sub> puede potenciar la respuesta a otros vasoconstrictores endógenos (Rapoport, 1993) regula el tono del músculo liso vascular (De Moraes y col., 1997). Estos efectos son mediados por dos subtipos de receptores, FP<sub>A</sub> y FP<sub>B</sub> (Srinivasan y col., 2002) acoplados a proteínas G<sub>q</sub>; también existen agonistas que comparten los receptores TP del TXA<sub>2</sub> (Cracowski y col., 2002) (fig.6).



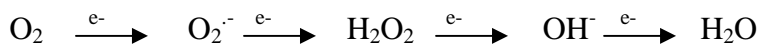
**Figura 6:** Síntesis y mecanismos de acción de los prostanoideos.

### III.c. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

La generación de especies reactivas de oxígeno, está asociada al metabolismo normal de todas las células (Li y col., 1997). Sin embargo, el estrés oxidativo ha sido identificado como un factor patogénico en enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, la diabetes y la hipercolesterolemia (Cai y Harrison, 2000; Wolin, 2000).

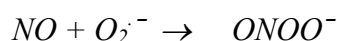
En las membranas celulares realizan su función diversas enzimas que utilizan el oxígeno como aceptor de electrones y, consecuentemente, llevan a la formación del anión

superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que se produce por la reducción de una molécula de  $O_2$ . Los aniones superóxido pueden ejercer su acción directamente sobre el sistema vascular o sirviendo de sustrato para la formación de otras ROS. A partir del  $O_2^{\cdot-}$  se forman el resto de especies reactivas de oxígeno:



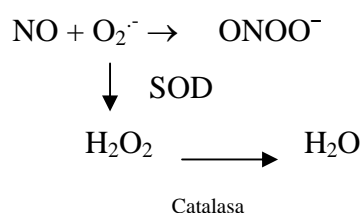
Como especies reactivas de oxígeno se incluyen los aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ). Estos compuestos poseen un electrón desapareado, situación que les confiere una alta capacidad de reacción.

El NO tiene un electrón desapareado, por lo que puede reaccionar con moléculas con un electrón desapareado (como es el anión superóxido), eliminándolo. De esta manera se produce una reacción químicamente espontánea e irreversible (Wolin, 2000):



Cuando el  $O_2^{\cdot-}$  inactiva al NO, dificulta la vasorrelajación e induce apoptosis en las células endoteliales, provocando un fallo en la continuidad del endotelio que favorece la aparición de fenómenos trombóticos promoviendo la adhesión de diferentes células al endotelio. Adicionalmente, el producto de la reacción, el peroxinitrito, es un fuerte oxidante con importantes efectos biológicos como nitrosilación de proteínas (Munzel y col., 1997).

El mantenimiento de los niveles de ROS depende tanto de su producción como de su eliminación. Por tanto, existen distintos sistemas, enzimáticos y no enzimáticos, encargados de eliminar los radicales libres producidos en exceso. Así, la superóxido dismutasa (SOD) a partir de  $O_2^{\cdot-}$  produce  $H_2O_2$ , eliminando los aniones superóxido del medio y evitando así la formación de peroxinitrito (Fridovich, 1997):



A su vez, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es eliminado por la acción de la catalasa y/o de la glutatión peroxidasa (GSH) que reducen el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (Dhalla y col., 2000). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  estimula la migración y proliferación de células endoteliales favoreciendo la angiogénesis (Taniyama y Griendling, 2003).

Adicionalmente, el  $\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden regular la actividad de las metaloproteasas de la matriz del músculo liso vascular que degradan los proteoglicanos y el colágeno, produciendo cambios en la estructura vascular (Wolin, 2000). Bajos niveles de especies reactivas de oxígeno, estimula el crecimiento celular, por el contrario, se ha demostrado que altos niveles de especies reactivas de oxígeno inducen apoptosis (Luczak y col., 2004). Además de los cambios sobre estructura y del crecimiento vascular, las especies reactivas de oxígeno son capaces de modular las respuestas contráctiles. De hecho el  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  estimulan la contracción tras movilizar el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en los depósitos intracelulares y activar el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Touyz, 2000). Sin embargo, en otras condiciones el peroxinitrito y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producen vasodilatación (Martín y col., 2005).

### III.d. Otros reguladores del tono vascular

#### *- Factor hiperpolarizante dependiente de endotelio (EDHF)*

El endotelio libera otra sustancia que induce relajación mediante hiperpolarización de la membrana muscular, llamada factor hiperpolarizante dependiente de endotelio (Komori y Suzuki, 1987). Se ha sugerido que se trata de un metabolito lábil del ácido araquidónico en el cual parece estar implicado la vía del citocromo P450 (Campbell y col., 1996), mientras que otros autores sugieren que se trata del  $\text{K}^+$  (Edwards y col., 1998), y/o peróxido de hidrógeno (Feletou y Vanhoutte, 2006). La hiperpolarización y relajación inducida por el EDHF parece ser debida a un incremento en la conductancia del  $\text{K}^+$  en la membrana del músculo liso vascular, a través de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o dependientes de ATP (Gluais y col., 2005), dependiendo del lecho vascular.

La contribución del EDHF a la relajación dependiente de endotelio varía en función de la arteria estudiada. Este factor actúa fundamentalmente en vasos de resistencia, por lo que parece jugar un papel importante en la regulación local de las resistencias periféricas vasculares (García-Pascual y col., 1996). Además, diversos estudios sugieren que el EDHF

participa de manera especialmente importante en la respuesta a agentes vasodilatadores dependientes de endotelio en la circulación coronaria y en la mesentérica (Vázquez-Pérez y col., 2001). Adicionalmente su participación se ve modificada en situaciones fisiopatológicas en las que se produce la disminución de otros factores endoteliales como el NO (Sunano y Sekiguchi, 2003).

- *Endotelina (ET)*

Es un péptido vasoconstrictor que contribuye a la regulación del tono vascular y proliferación celular. Se conocen tres isoformas ET-1, ET-2 y ET-3, diferenciándose en su potencia de acción vasoconstrictora (Yanagisawa y Masaki, 1989). La ET-1 se sintetiza tanto en condiciones basales como en respuesta a estimulación mecánica, química y humoral, y actúa a través de receptores específicos, de los cuales se han descrito dos subtipos, localizados en células del músculo liso vascular (ET<sub>A</sub>) y en las células endoteliales (ET<sub>B</sub>) (Patocka y col., 2005).

La activación de los receptores ET<sub>A</sub> acoplado a PLC en el músculo liso induce la formación de IP<sub>3</sub> y de DAG que aumenta la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y la actividad de la proteína quinasa C (PKC). Como consecuencia se produce vasoconstricción y, a largo plazo, proliferación celular (Patocka y col., 2005). Por otra parte, la estimulación de los receptores ET<sub>B</sub> endoteliales produce la liberación de NO y PGI<sub>2</sub> (Patocka y col., 2005).

- *Angiotensina II (Ang II)*

La Ang II juega un importante papel en la regulación de las funciones renales, vasculares y cardíacas. Sus funciones principales se vinculan a la modulación de la transmisión sináptica, estimulación de secreción de la vasopresina, vasoconstricción, estimulación de la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal, y acción mitogénica. Modula la excreción renal de Na<sup>+</sup>, y la contracción y relajación miocárdica y el tono vascular (Touyz y Schiffrin, 2000). De esta forma es un factor regulador muy importante de la integridad anatómica-funcional de la pared arterial y en procesos que modulan la presión arterial. Las múltiples acciones de la Ang II están mediadas por complejos sistemas de señalización que son activados por la unión hormona-receptor.

La Ang II tiene dos tipos de receptores, AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> (de Gasparo y col., 1990). El AT<sub>1</sub> posee siete dominios transmembrana, del tipo acoplado a una proteína G que interviene en múltiples rutas de señalización intracelulares que comprenden al Ca<sup>2+</sup>, fosfolípidos, quinasas y radicales libres de oxígeno. El receptor AT<sub>2</sub> contiene siete dominios transmembrana unidos a proteínas G heterotriméricas (Allen y cols., 2000) y posee un 37% de homología con el receptor AT<sub>1</sub>. Los AT<sub>1</sub> se encuentran en las glándulas suprarrenales, en el cerebro, en el riñón, en el músculo liso vascular y en el corazón, mientras que los receptores AT<sub>2</sub> se encuentran en grandes cantidades en los tejidos fetales pero su presencia disminuye después del nacimiento, lo que sugiere un importante papel de estos receptores en el desarrollo embrionario. Los receptores AT<sub>2</sub> juegan un papel importante en la inhibición del crecimiento y diferenciación de las células musculares lisas durante la gestación, influyendo en la estructura y función de los lechos vasculares (Touyz y Schiffrin, 2000). En la aparición de diversas enfermedades cardiovasculares el receptor AT<sub>2</sub> se reexpresa produciendo remodelización vascular (Horiuchi y cols., 1999).

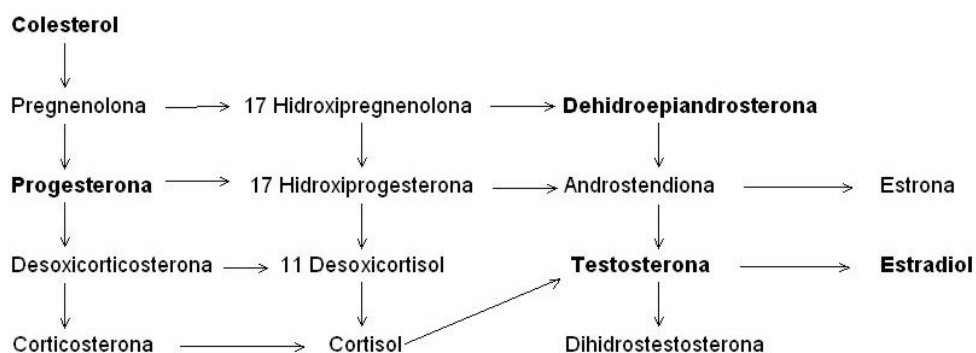
La Ang II a través de su receptor AT<sub>1</sub> estimula la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> por la PLC produciendo un aumento en la formación de IP<sub>3</sub> y DAG (Ishizaka y cols., 1998). El IP<sub>3</sub> estimula la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplasmático, aumentando la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, y, por tanto, provocando la contracción de las células del músculo. Por otro lado, el DAG estimula la PKC, que se transloca a la membrana plasmática para fosforilar y activar proteínas que intervienen en la contracción y el crecimiento celular. La PKC media también la alcalinización intracelular del medio a través de la activación del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, el intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> y la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa lo que también produce contracción muscular debido al aumento de las concentraciones intracelulares de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> y al aumento de la sensibilidad de la maquinaria contráctil al Ca<sup>2+</sup>. La Ang II a través del receptor AT<sub>2</sub> media la activación de proteínas tirosín fosfatasas que van a inhibir el crecimiento celular a través de la inhibición de MAPK (ERK). Aunque el mecanismo aún no está claro, AT<sub>2</sub> media vasodilatación a través de la liberación de NO y de nucleótidos cíclicos (Horiuchi y cols., 1999) e induce la inhibición del crecimiento y proliferación del músculo liso vascular y cardíaco (Henrion y col., 2001). La Ang II participa en el mantenimiento de la hipertensión arterial mediante su efecto vasoconstrictor directo, activación del SN simpático, incrementando la liberación de aldosterona y elevando la producción de aniones superóxido, sobre todo en el endotelio y en la adventicia, por medio de la NADPH oxidasa ligada a la membrana (Laursen y col., 1997).

## IV. HORMONAS SEXUALES

### IV.a. Características generales.

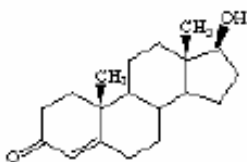
#### *Andrógenos*

Los andrógenos inducen el desarrollo de los caracteres sexuales primarios en el embrión y de los caracteres sexuales secundarios en la pubertad. Son los responsables del crecimiento general y síntesis proteica que se refleja en los cambios del esqueleto y de la musculatura característicos del hombre. Se sintetizan principalmente en las células de Leydig de los testículos, en menor medida en la corteza adrenal de varones y en mujeres, en cantidades mínimas, en el ovario. Al igual que el resto de las hormonas de naturaleza esteroide los andrógenos se sintetizan a partir del colesterol (fig.7).



**Figura 7:** Ruta de síntesis de las hormonas sexuales (adaptado de <http://www.fisterra.com>).

Los andrógenos más importantes son la testosterona (fig.8), la androstendiona y la dehidroepiandrosterona, precursora del resto de andrógenos y también del estradiol.



**Figura 8:** Estructura de la testosterona.

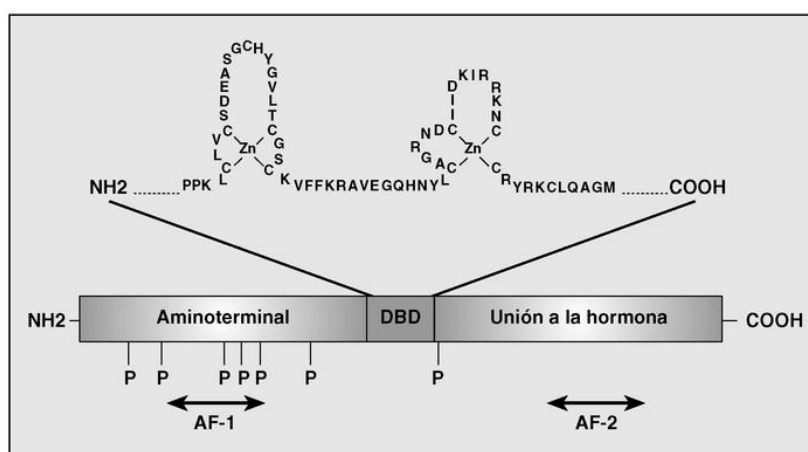
La cantidad de testosterona es tan superior a las demás, que se puede considerar la hormona testicular más importante, si bien la mayoría de ella se convierte en los tejidos efectores en dihidrotestosterona (DHT), una hormona más activa, pues posee mayor afinidad por el receptor androgénico intracelular (Guyton y Hall, 2006).



Existe una fracción considerable de la testosterona producida que se fija a albúmina o a globulinas de unión a hormonas sexuales para ser transportada por el torrente sanguíneo, siendo mínima su concentración libre en suero. De esta forma se mantiene inactiva hasta la unión con su receptor específico (Heinlein y Chang, 2002). Se desconocen los factores responsables de esta transferencia, al igual que cómo provoca la célula la disociación del complejo hormona-globulina, pero se cree que depende de la concentración plasmática de la hormona (Heinlein y Chang, 2002). Una vez en la célula, la hormona se une a su receptor individual, localizado en el citoplasma y/o en el núcleo, se induce una dimerización del receptor y su consecuente activación (Wong y col., 1993).

Los receptores de andrógenos, al igual que los de otros receptores esteroideos están compuestos de varios dominios funcionales (Evans, 1988) (fig.9):

1. El dominio regulador y fijador de los esteroides: se encuentra en el dominio C-terminal. Tiene varios sitios de fosforilación y está comprometido en la activación del complejo hormona-receptor.
2. El dominio de unión a DNA: se encuentra en la parte media y es esencial para la activación de la transcripción. Esta porción es la responsable de controlar qué gen será regulado por el receptor.
3. La región bisagra: se encuentra entre los dos dominios anteriores; contiene un área de señal importante para el movimiento del receptor hacia el núcleo después de su síntesis en el citoplasma. Es una región hidrofílica variable en los diferentes receptores.

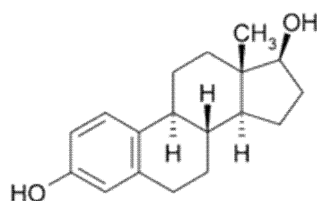


**Figura 9:** Una región N-terminal hipervariable, que regula la actividad transcripcional, un dominio central de unión a DNA (DBD) altamente conservado, una región bisagra, y un largo dominio C-terminal, de unión a ligando. También se muestran los lugares de fosforilación, así como las zonas de unión independiente del ligando (AF-1) y dependiente del ligando (AF-2).

La interacción de las hormonas sexuales masculinas con los receptores androgénicos producen efectos genómicos, entre los que, podemos encontrar la activación de MAPKs y otros factores de transcripción que inducen el crecimiento y proliferación de distintas células (Gerald y col. 2002). También existen receptores androgénicos de membrana que inducen efectos no genómicos ya que no son bloqueados por inhibidores de la transcripción génica (Gerhard y Ganz, 1995; Farhat y col., 1996). Entre otros efectos encontramos un incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  debido a un aumento en la formación de  $IP_3$  (Estrada y col., 2000) o la fosforilación de ERK1/2 (Estrada y col., 2003).

### ***Estrógenos***

Los estrógenos son los responsables de los caracteres secundarios femeninos y de los cambios en la composición corporal. Los estrógenos secretados durante la primera mitad del ciclo ovárico se encargan de la tarea crucial de preparar el tracto reproductor para recibir y transportar gametos, a la vez que proporcionan un medio favorable para la fecundación e implantación. Además de estas acciones específicas sobre el tracto reproductor, actúan sobre distintos tejidos ya que modulan el metabolismo (al ser anabolizantes), el equilibrio óseo, fragilidad capilar, valores plasmáticos de colesterol, etc. Los ovarios, y en menor medida la corteza suprarrenal, constituyen la principal fuente de estrógenos circulantes en mujeres premenopáusicas. Los estrógenos se forman a partir del colesterol. En este proceso de síntesis la progesterona y la testosterona se sintetizan en primer lugar, después en la fase folicular del ciclo ovárico, antes de que pueda abandonar los ovarios, casi toda la testosterona y gran parte de la progesterona son convertidas en estrógenos por las células granulosas. El principal producto secretor es el  $17\beta$ -estradiol, seguido por la estrona y el estriol (fig.10).



**Figura 10:** Estructura del  $17\beta$ -estradiol.

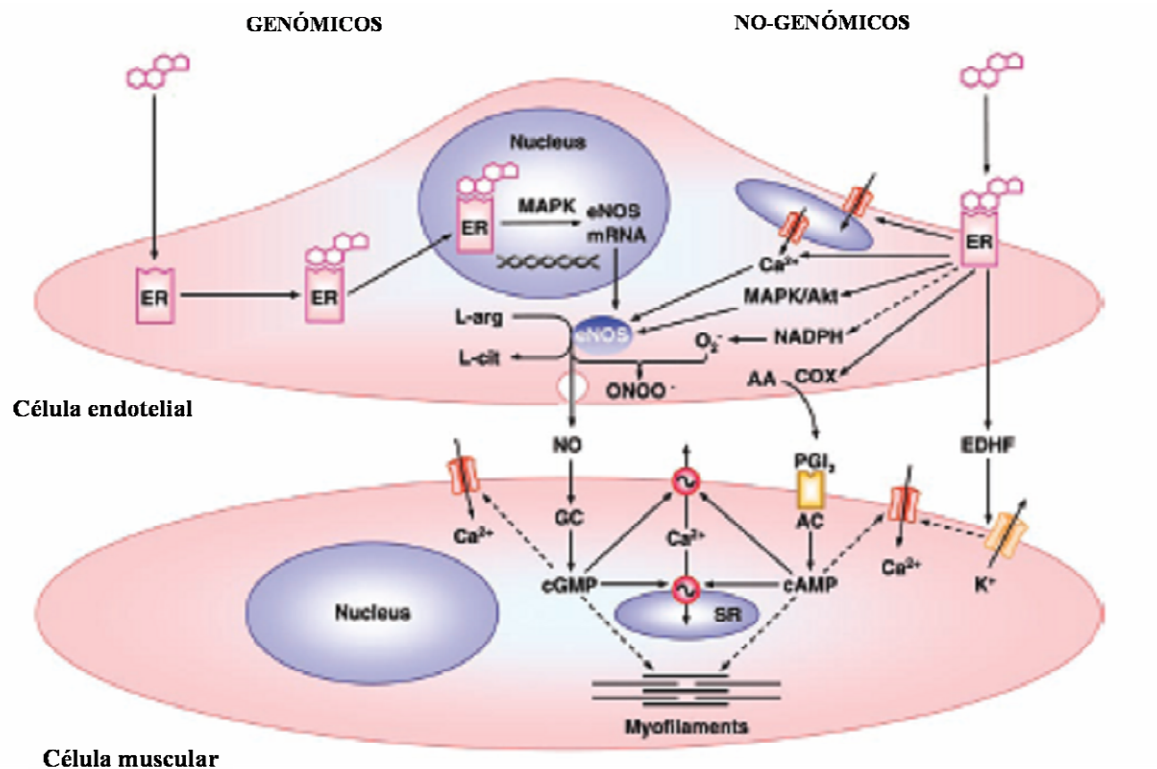
El estradiol secretado se oxida de manera reversible hasta generar estrona y esos dos estrógenos pueden convertirse en estriol, transformaciones que ocurren principalmente en

hígado. En varones y en mujeres postmenopáusicas, la principal fuente de estrógenos es el estroma del tejido adiposo, donde se sintetiza estrona a partir de DHEA, secretada por la corteza suprarrenal (Valle y col., 2006). De este modo, la concentración de estrógenos está regulada en parte por la disponibilidad de precursores androgénicos (Mendelson y Simpson, 1987).

Al igual que los andrógenos la concentración de estradiol libre en plasma es baja, circula unida a la globulina fijadora de  $17\beta$ -estradiol (Anderson, 1974), también se une aunque con menos afinidad a la albúmina, de esta manera el estradiol se mantiene inactivo hasta la unión con su receptor. Existen dos subtipos de receptores estrogénicos, alfa (Green y col., 1986) y beta (Kuiper y col., 1996).  $ER\alpha$  se expresa en la mayoría de órganos femeninos incluyendo los ovarios, las glándulas mamarias, el sistema cardiovascular y el cerebro. En contraste,  $ER\beta$  está altamente expresado en el ovario, y aunque está presente en menor medida en otros tejidos, como en el vascular tanto en células endoteliales como musculares lisas especialmente en hembras (Hodges y col., 2000).

Poseen la estructura típica de los receptores esteroideos mencionada anteriormente; un dominio de unión a ADN, un dominio C-terminal o de unión al ligando y una región N-terminal hipervariable. Estos receptores parecen encontrarse tanto en el citoplasma como en el núcleo. Una vez unido el estrógeno a ellos, los complejos estrógeno-receptor se unen a regiones específicas del ADN, como los ERE (*estrogen-response elements*), y modulan la transcripción de diversos genes.

En los últimos años se ha demostrado que existe como en el caso de los andrógenos un mecanismo de acción “no-genómico” porque no depende de la unión del complejo estrógeno-receptor al ADN genómico. Este mecanismo está implicado en varias de las acciones de los estrógenos a nivel de los tejidos no reproductivos, como la vasodilatación, estimulación de la proliferación de osteoblastos, la producción de colágeno y disminución de la resorción ósea. Esas acciones parecen depender de la fijación del estrógeno a una variante de receptores estrogénicos unidos a la membrana celular (mER). Su activación entre otros efectos puede aumentar la liberación de NO y GMPc (Russel y col., 2000) produciendo vasodilatación o estimular la vía de la PKC (Le Mellay y col., 1997) que controla multitud de respuestas celulares (fig.11).



**Figura 11:** Mecanismo de acción de los estrógenos. Mediante los mecanismos genómicos, los estrógenos se unen a sus receptores ER situados en el citosol o núcleo de las células endoteliales, permitiendo la activación de MAPKs, incrementando la transcripción génica, la proliferación de células endoteliales, e incrementando la síntesis de la eNOS. En los mecanismos no-genómicos, los estrógenos se unen a la sus ER en la membrana de las células endoteliales e incrementan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endopásmico y estimulan la vía de las MAPK/Akt, permitiendo la activación de la eNOS e incrementando la producción de NO. Los ER pueden también inhibir la NADPH oxidasa, previniendo la formación de  $\text{O}_2^-$ . Del mismo modo, los ER pueden activar la COX incrementando sus derivados.

#### **IV.b. Relación de las hormonas con la función vascular.**

Se ha demostrado una relación entre los niveles de hormonas sexuales y aparición de enfermedades cardiovasculares. La incidencia de las mismas es menor en mujeres premenopáusicas que en hombres de la misma edad (Teede, 2007), igualándose en la menopausia. Por todo ello tradicionalmente se ha atribuido un efecto deletéreo a los andrógenos (Baker y col., 1978; Hutchison y col., 1997) y un efecto protector a los estrógenos (Farhat y col., 1996; Joswig y col., 1999) sobre el sistema cardiovascular. Sin embargo, recientemente el papel de los andrógenos en el sistema vascular está recibiendo considerable interés (Sadrer y Celermajer, 2002) y existen evidencias experimentales y clínicas que indican que los andrógenos poseen efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular en machos, semejantes a los descritos para los estrógenos en hembras (Jones y col., 2004; Liu y col., 2003, Perusquia 2003, Littleton-Kearney y Hurn 2004).

##### ***Andrógenos***

Los andrógenos y derivados androgénicos actúan sobre la pared arterial, y algunos de sus efectos deletéreos están mediados por las modificaciones en el perfil lipídico (incrementando LDL), en los mecanismos hemostáticos (agregación plaquetaria y actividad fibrinolítica), y en la respuesta vasomotora (Hutchison y col, 1997).

Sin embargo, recientemente se ha puesto de manifiesto la relación entre hipotestosteronemia e incidencia de enfermedades cardiovasculares como el infarto de miocardio (Mitchell y col., 1994) y la cardiopatía isquémica (Sewdarsen y col., 1990). Por otra parte, también se ha descrito que la administración a corto plazo de testosterona mejora la resistencia cardíaca a isquemia por esfuerzo, sugiriendo la existencia de mecanismos vasodilatadores inducidos por esta hormona (Rosano y col., 1999).

Se ha descrito la existencia de receptores de andrógenos tanto en células musculares lisas como endoteliales, por lo que su activación influye en la función de estas células regulando el tono vascular (Honda y col., 1999). La testosterona puede modular la contracción inducida por diferentes agentes. Así, modula la respuesta vascular inducida por la activación del receptor adrenérgico  $\alpha_2$  a través de mecanismos dependientes e independientes de endotelio (Blanco-Rivero y col., 2006a). También modula la contracción

inducida por cloruro potásico, vasopresina y norepinefrina en arteria caudal (Barbagallo y col., 1995), mesentérica (Martín y col., 2005) y aorta (Wang y col., 2002) de distintas especies animales.

Paralelamente, la testosterona modula la respuesta vasodilatadora, pudiendo ejercer un efecto vasodilatador directo en la aorta de rata la cual es parcialmente dependiente de endotelio mediante el aumento de la liberación de NO (Costarella y col., 1996). Sin embargo, existen estudios que demuestran que la relajación inducida por testosterona se lleva a cabo hiperpolarizando la membrana de la célula muscular, ya que no se ve modificada en presencia de inhibidores de la síntesis del NO o GC (Yue y col., 1995; Chou y col., 1996). Por otra parte, la testosterona puede promover hiperpolarización dependiente de endotelio de las células del músculo liso vascular, de forma dependiente de concentración. Esta relajación se puede producir de forma tanto dependiente como independiente de endotelio, e implica la acción de los canales de  $K_{Ca}$  y  $K_{ATP}$  (Honda y col., 1999).

Adicionalmente a los efectos vasodilatadores directos de la testosterona, ésta modula la respuesta a otros agentes vasodilatadores (Quan y col., 1999), tanto dependientes (Ferrer y col., 1999) como independientes (Martín y col., 2005) de endotelio. Aunque existen resultados contradictorios uno de los factores mejor estudiados ha sido el NO. Así, se ha descrito que la testosterona y sus derivados aumentan (Liu y Dillon, 2002; Simoncini y col., 2003) disminuyen (Chatrath y col., 2003; Mukherjee y col., 2001) o no modifican (Blanco-Rivero y col., 2006a) la actividad eNOS. Respecto al efecto vasodilatador del NO, la testosterona es capaz de aumentar la sensibilidad del músculo liso vascular al NO. Se ha demostrado una disminución del efecto vasodilatador de la ACh en ratones feminizados, en los que hay bajos niveles de testosterona (Jones y col., 2003), y un aumento de la respuesta vasodilatadora a nitroglicerina cuando se administra de forma exógena (Kang y col., 2002). Esta acción puede deberse a un aumento en los niveles de GMPc y/o actividad de la PKG (Deenadayalu y col., 2001). También existen estudios en los que la sensibilidad del músculo liso al NO no se modifica en aorta de machos castrados (Blanco-Rivero y col., 2006b).

Se ha comentado anteriormente el papel de las ROS en la regulación del tono vascular. En este sentido, se ha descrito que el nivel de aniones superóxido es dependiente del género, siendo mayor en machos que en hembras (Brandes y Muge, 1997), lo que podría estar asociado a la mayor aparición de alteraciones vasculares en machos (Harrison, 1994; Munzel y col., 1997). La mayoría de los estudios realizados sobre la formación de aniones superóxido se han centrado en el papel de las hormonas femeninas (White y col., 2005), sin embargo estudios más recientes han demostrado propiedades antioxidantes de los andrógenos (Békési y col., 2000; Yorek y col., 2002).

En este sentido, estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han mostrado que, aunque la actividad de la Cu/Zn SOD es mayor en aortas de machos castrados, existe una mayor producción de aniones superóxido en arterias de estos animales (Blanco-Rivero y col., 2006b).

Como se ha descrito anteriormente las células endoteliales también liberan prostanoideos vasoconstrictores y vasodilatadores, originados por el metabolismo del ácido araquidónico a través de la activación de la COX. Se ha descrito que la disminución de testosterona, relacionada con la edad, aumenta la actividad de la COX-2 en diferentes tejidos (Stewart y col., 2000; Chung y col., 2001).

También se ha comentado el papel funcional de los prostanoideos en la regulación del tono vascular, habiéndose descrito que uno de los prostanoideos vasoconstrictores producidos por la pared vascular que participa en la disfunción vascular asociada con diferentes factores de riesgo cardiovascular es el TXA<sub>2</sub> (Simionescu y col., 1983). Se ha descrito que el tratamiento con testosterona reduce la liberación de TXA<sub>2</sub> en aorta de ratas macho (Myers y col., 1996), mientras que la deprivación de hormonas sexuales masculinas incrementa la liberación de TXA<sub>2</sub> (Blanco-Rivero y col., 2006a).

Atendiendo a la expresión de la TXA<sub>2</sub> sintasa se ha descrito que la orquidectomía reduce (Gonzales y col., 2005) o no modifica (Blanco-Rivero, 2006a) la expresión de la misma. A cerca de los receptores TP, se ha descrito mediante experimentos de *binding*, que la testosterona aumenta la expresión de los TP en diversos tipos celulares (Matsuda y col., 1994) como células musculares lisas (Higashiura y col., 1997), y megacariocitos (Higashiura y col., 1996).

Con respecto a la modulación por hormonas sexuales de la respuesta contráctil inducida por el mimético del TXA<sub>2</sub> (U-46619), se ha descrito que es mayor en machos que en hembras

(Schorr y col., 1996). Sin embargo, existe controversia sobre el efecto específico de las hormonas sexuales masculinas. Así, experimentos de reactividad vascular han descrito que la respuesta contráctil al análogo de TXA<sub>2</sub> es similar en machos controles y en castrados, demostrando que la sensibilidad al TXA<sub>2</sub> no se ve modificada por orquidectomía, tanto en arterias cerebrales (Gonzales y col., 2005) como en mesentérica (Blanco-Rivero y col., 2006a) de rata, mientras que el tratamiento con testosterona aumenta la contracción al mimético del TXA<sub>2</sub> en arteria coronaria de cobaya (Schorr y col., 1994). A pesar de los múltiples estudios acerca de este prostanoide, es escasa y a veces contradictoria la información disponible sobre el efecto de los andrógenos en la función vascular del TXA<sub>2</sub> endógeno.

Por otra parte el papel en la función vascular de derivados de COX distintos al TXA<sub>2</sub> como la PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> que pueden actuar como vasoconstrictores bajo ciertas condiciones patológicas, está siendo objeto de numerosos estudios (Rapoport y col., 1996; Blanco-Rivero y col., 2007b; Gluais y col., 2006).

Se ha demostrado que los niveles de PGI<sub>2</sub> están aumentados en pacientes con aterosclerosis (Fitzgerald y col., 1987) y en hipertensión (Blanco-Rivero y col., 2005b). La PGI<sub>2</sub> posee un efecto vasodilatador a bajas concentraciones, mientras que a elevadas concentraciones el efecto es vasoconstrictor ya que activa receptores TP (Williams y col., 1994; Blanco-Rivero y col., 2005b). Respecto a la influencia de las hormonas sexuales masculinas se ha descrito que la testosterona disminuye la síntesis de PGI<sub>2</sub> tanto en segmentos de aorta de ratas hembras (Wakasugi y col., 1989) como en cultivos de células musculares lisas de aorta (Nakao y col., 1981) sin embargo otros estudios publican que la pérdida de hormonas sexuales masculinas produce disminución de PGI<sub>2</sub> en aorta de rata (Cignarella y col., 2000a).

Respecto a la PGE<sub>2</sub> los resultados son escasos y contradictorios. Se ha descrito que el tratamiento con testosterona reduce la liberación de PGE<sub>2</sub> en células endoteliales de aorta de rata (Myers y col., 1996), del mismo modo se ha publicado que la orquidectomía incrementaba la liberación de PGE<sub>2</sub> y la expresión de la PGE<sub>2</sub> sintasa microsomal en ratas hipertensas (Sullivan y col., 2005). Por el contrario, también se ha descrito que el tratamiento con testosterona incrementa la liberación de PGE<sub>2</sub> en vasos deferentes de rata (Saito y col., 1986), en células endoteliales de aorta de cerdo (Seillan y col., 1983) y en arterias cerebrales de rata (Razmara y col., 2005).



La información acerca de influencia de las hormonas sexuales masculinas sobre la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  es escasa. Se ha publicado que la testosterona incrementa la liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en células endoteliales de aorta de cerdo sólo en hembras (Seillan y col., 1983) o la disminuye en hipotálamo (Gecse y col., 1981). Respecto a su efecto vasomotor se ha descrito que la testosterona incrementa la respuesta contráctil en aortas de hembras (Maddox y col., 1987). Estos datos, ponen de manifiesto la diversidad de resultados encontrados acerca del efecto de los andrógenos sobre la síntesis y función de los prostanoïdes. Probablemente esta situación sea debida a diferencias en los modelos y condiciones experimentales utilizados por lo que sería interesante el estudio sistemático de la posible influencia de las hormonas sexuales sobre la liberación y función de los prostanoïdes.

Experimentos previos, realizados por nuestro grupo de investigación, han puesto de manifiesto que la relajación inducida por ACh es mayor en aortas procedentes de machos castrados que en controles, como consecuencia de la mayor producción de  $\text{O}_2^-$  que activan  $\text{K}_{\text{Ca}}$  (Ferrer y col., 1999). Más recientemente, se ha demostrado que la liberación de NO endotelial y la expresión de eNOS en aorta de rata no está modificada por la orquidectomía (Blanco-Rivero y col., 2006b). Puesto que las ROS pueden activar COX-2 y teniendo en cuenta que en nuestro modelo experimental, la orquidectomía produce un incremento en la formación de aniones superóxido (Blanco-Rivero y col., 2006b; Martín y col., 2005) sería interesante analizar la influencia de las hormonas sexuales sobre la producción de derivados de COX-2.

Por otra parte, se ha descrito que el NO modula la síntesis de distintos prostanoïdes (Mollace y col., 2005). Sin embargo la información del efecto de los prostanoïdes sobre la síntesis de NO es prácticamente inexistente.

Por todo ello, respecto a las hormonas sexuales masculinas, nuestro objetivo es analizar la influencia de dichas hormonas sobre:

- la síntesis y el efecto vasomotor de distintos prostanoïdes
- la participación de los distintos prostanoïdes en la respuesta inducida por ACh
- la interacción de los distintos prostanoïdes con la liberación de NO endotelial.

### ***Estrógenos***

Se ha considerado a los estrógenos como una hormona vasoprotectora puesto que el inicio de la menopausia está asociado a la aparición de alteraciones cardiovasculares (Farhat y col., 1996). Los estrógenos poseen propiedades cardioprotectoras que resultan de una gran variedad de acciones entre las que se incluyen modulación del metabolismo lipídico, expresión de moléculas de adhesión leucocitaria y migración de VSMCs en la pared vascular (Bush y col., 1987, Schnaper y col., 2000).

Existen evidencias experimentales de que los estrógenos disminuyen la progresión de placas de ateroma atribuido en parte al bloqueo de los receptores para la LDL o a la degradación de los mismos a nivel intracelular. Por otro lado, la inhibición de la aterogénesis viene ligada a un incremento de los receptores de HDL y al bloqueo de la adherencia leucocitaria, adhesividad plaquetaria o los factores de crecimiento del endotelio vascular y el proceso inflamatorio (Cheng y col., 1991).

Estudios experimentales básicos y clínicos han puesto de manifiesto la acción local de los estrógenos en la pared vascular (White y col., 1995) a través de mecanismos genómicos como el aumento de la expresión o actividad de la eNOS (Adams y col., 1989) estimulando de este modo la producción de NO por el endotelio contribuyendo a los efectos beneficiosos de los estrógenos en el sistema cardiovascular (Momoi y col., 2003, Fletcher y Colditz, 2002). También modularían el número y la sensibilidad de los receptores muscarínicos presentes en las células musculares y endoteliales (Gisclard y col., 1988) y/o inhibirían otros mecanismos vasoconstrictores (Reis y col., 1994). Sin embargo, también existen estudios que describen que los estrógenos no modifican la expresión y activación de la eNOS (Nawate y col., 2005).

Paralelamente a los andrógenos, los estrógenos también presentan a niveles fisiológicos efectos “no genómicos” que producen vasodilatación activando eNOS y la PGI<sub>2</sub> sintasa, regulando también de este modo el tono vascular (Chambliss y col., 2000; Hermenegildo y col., 2006). El 17β-estradiol produce un efecto vasodilatador directo independiente de endotelio inhibiendo los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje en las células musculares lisas disminuyendo así el flujo de Ca<sup>2+</sup> (Jiang y col., 1991; Valverde y col., 1999; Perusquia y Navarrete, 2005).

Los estrógenos producen efectos sobre el sistema simpático dónde pueden inhibir la síntesis de catecolaminas, incrementar la densidad de los receptores androgénicos α<sub>2</sub> (Du y col.,

1994), la afinidad de los  $\alpha_1$  (Colucci y col., 1982) y activar los receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Ferrer y col., 1996).

Asimismo el 17 $\beta$ -estradiol modula la contracción inducida por distintos agentes vasoactivos como la vasopresina (Stallone y col., 1991), Ang II (Proudler y col., 1995) o en menor medida la ET (Shay y col., 1993; Nilsson y Gustafsson, 2000). La administración exógena de estrógenos pueden producir vasoconstricción aumentando la síntesis de aniones superóxido en arterias coronarias (White y col., 2005) e incrementando la sensibilidad de algunos prostanoideos contráctiles (Miller y Vanhoutte, 1990).

Los estrógenos poseen un efecto antioxidante ya que con la edad y la pérdida de hormonas sexuales aumenta el estrés oxidativo. En este sentido se ha descrito que la ausencia de hormonas sexuales femeninas produce un aumento en la generación de aniones superóxido (Zhang y col., 2007) y que existe una mayor actividad de enzimas detoxificantes como la SOD (Sagredo y col., 2008) para intentar eliminar ese aumento.

Se ha descrito que las hormonas sexuales femeninas pueden ejercer un efecto directo no-genómico en aorta de rata que conlleva la activación de la COX, aumentando la liberación de los prostanoideos derivados de ella (Selles y col., 2005). También se ha descrito que los estrógenos inducen la expresión de COX-2 en cultivos de células endoteliales humanas (Pedram y col., 2002; Akarasereenont y col., 2000).

En cuanto a los prostanoideos derivados de COX, se ha descrito que las hormonas sexuales femeninas incrementan la liberación de TXA<sub>2</sub> en aorta de rata (Selles y col., 2005) o en cultivos de células endoteliales (Witter y col., 1984) y musculares lisas (Chang y col., 1980) de rata o no modificarla (Cignarella y col., 2000b). El incremento de la reactividad de las células musculares a los prostanoideos vasocontráctiles en hembras puede deberse a que esté incrementada la expresión y/o actividad de las enzimas como COX y/o TXS (Li y col., 2002) que median la formación de estos vasoconstrictores locales, y/o al incremento de la expresión de los receptores y/o mediadores intracelulares. Estudios previos demuestran que los estrógenos pueden incrementar la expresión o afinidad de los receptores TP en aorta de rata (Li y col., 2002; Matsuda y col., 1995). Sin embargo, con respecto al efecto contráctil del TXA<sub>2</sub> los resultados obtenidos son contradictorios, ya que la pérdida de hormonas sexuales femeninas no produce diferencias en la contracción al mimético del TXA<sub>2</sub>, U-46619, en arterias cerebrales de rata (Momoi y col., 2003), la incrementa en

mesentérica (Davidge y Zang, 1998) y la reduce en pulmón y aorta de rata (Farhat y Ramwell, 1992; Li y Stallone, 2005).

Respecto a la influencia de las hormonas sexuales femeninas sobre la  $\text{PGI}_2$  también existe controversia, ya que se ha descrito que los estrógenos incrementan (Myers y col., 1996), disminuyen (Lennon y Poyser, 1987) o no modifican (Lennon y col., 1988; Maugeri y col., 1989) la liberación de  $\text{PGI}_2$ .

Con respecto al efecto de los estrógenos sobre la expresión de la  $\text{PGI}_2$  sintasa también existen resultados contradictorios. Se ha descrito que el tratamiento con estrógenos en ratas ovariectomizadas incrementa su síntesis en arterias cerebrales (Duckles y Krause, 2007; Ospina y col., 2002), no la modifica en arterias uterinas (Wu y col., 1999) ni coronarias ovinas (Rupnow y col., 2002) o la reduce en aorta de ratas macho (Myers y col., 1996). Respecto a la respuesta vascular a  $\text{PGI}_2$  se ha descrito que el tratamiento con estrógenos puede incrementarla en aorta de conejo (Miller y Vanhoutte, 1990). En los estudios en los que se observa que los estrógenos aumentan la liberación de  $\text{PGI}_2$  (Ospina y col., 2003; Selles y col., 2005; Karpati y col., 1980) este resultado puede ir asociado a un aumento (Korita y col., 2004) o no modificación (Myers y col., 1996) en la expresión de  $\text{PGI}_2$  sintasa.

Atendiendo al prostanoide  $\text{PGE}_2$  se ha descrito que en ausencia de hormonas sexuales femeninas se puede producir un incremento de la liberación de  $\text{PGE}_2$  en aorta de rata (Zamorano y col., 1995). Sin embargo, la estimulación con estrógenos no produce diferencias en la síntesis de las mismas (Selles y col., 2005; Ospina y col., 2003). En lo que a la respuesta vascular a  $\text{PGE}_2$  se refiere, se ha descrito que el tratamiento con estrógenos no la modifica en aorta de conejo (Miller y Vanhoutte, 1990) o que la disminuye en el músculo detrusor de ratas ovariectomizadas (Borda y col., 1983).

Poco se ha descrito a cerca de influencia de los estrógenos sobre la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , se ha publicado que el  $17\beta$ -estradiol incrementa su liberación en células endoteliales de aorta de cerdo (Seillan y col., 1983) y en hipotálamo (Gecse y col., 1981), o no la modifica en arterias cerebrales de rata (Ospina y col., 2003). Sin embargo, algunas publicaciones afirman que es en ausencia de hormonas sexuales femeninas dónde se produce un incremento de la liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en aorta de rata (Zamorano y col., 1995). Respecto a su efecto vasomotor se ha descrito que el tratamiento con estrógenos incrementa la respuesta

contráctil en aorta de ratas (Maddox y col., 1987) o no la modifica en aorta de conejo (Miller y Vanhoutte, 1990).

Al igual que lo comentado en el apartado de andrógenos, esta variabilidad en los resultados dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas justificaría la realización de un estudio sistemático sobre el efecto de las hormonas sexuales femeninas en la liberación y función de los prostanoïdes.

Respecto a la ACh, en ausencia de estrógenos se ha demostrado una reducción de la relajación a ACh en aorta de rata (Yamaguchi y col., 2001). El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol incrementa la vasodilatación inducida por ACh en arterias femorales de conejo (Gisclard y col., 1988), en coronarias de mono (Williams y col., 1990) y en aorta de rata (Gonzales y col., 2001) sugiriendo que opera con un mecanismo endotelio-dependiente. Con respecto a la liberación de NO existen resultados contradictorios pues se ha descrito que los estrógenos no modifican (Riveiro y col., 2001) o aumentan (Meyer y col., 1997) la actividad de la eNOS.

En base a estos datos y teniendo en cuenta que el papel de las hormonas sexuales femeninas sobre el efecto del NO endotelial dependiendo del lecho estudiado es variado, y que no existen estudios sistemáticos que analicen la influencia de estas hormonas en la liberación y función de los distintos prostanoïdes, nuestro segundo objetivo será analizar la influencia de las hormonas sexuales femeninas en la liberación y función del NO y prostanoïdes para ello analizaremos:

- la influencia de dichas hormonas en la liberación y función del NO
- la liberación y efecto vasomotor de los distintos prostanoïdes
- la participación de distintos prostanoïdes en la respuesta inducida por ACh.
- interacción de los distintos prostanoïdes con la liberación de NO endotelial.

Globalmente, este estudio comparativo nos permitirá obtener información a cerca de los mecanismos reguladores de las hormonas masculinas y femeninas, en machos y en hembras, sobre la liberación y función del NO y prostanoïdes.

## **Objetivos**

Los objetivos concretos planteados en el siguiente trabajo han sido analizar en aorta de ratas macho y hembra, la influencia de las correspondientes hormonas sexuales endógenas sobre:

1. la participación del NO endotelial en la relajación inducida por ACh valorando:

- la inhibición de la síntesis de NO sobre la respuesta a ACh
- expresión de la eNOS
- liberación de NO
- la respuesta vasomotora al donante de NO, nitroprusiato sódico

2. la participación de prostanoïdes en la relajación inducida por ACh valorando:

- expresión de COX-1 y COX-2
- la liberación de los prostanoïdes TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y PGE<sub>2</sub>
- la respuesta vasomotora inducida por los anteriores prostanoïdes
- el efecto de distintos bloqueantes de la síntesis o de la respuesta vasomotora de los anteriores prostanoïdes sobre la respuesta inducida por ACh

3. la interacción de los prostanoïdes con el NO valorando:

- el efecto de los distintos inhibidores de la síntesis de prostanoïdes sobre la liberación de NO inducida por Ach.

## **Materiales y Métodos**



## **I. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

Se emplearon ratas macho y hembras Sprague-Dawley de 6 meses de edad, que a su vez se dividieron en dos grupos: machos (controles y orquidectomizados) y hembras (controles: en estro y ovariectomizadas). Todos los animales fueron estabulados en el animalario de la universidad Autónoma de Madrid de acuerdo con las normas establecidas en 609/86 CEE y R.D. 233/88 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (12 h. de ciclo luz/oscuridad y alimentación estándar con pienso y agua *ad libitum*).

La eliminación de hormonas sexuales se indujo quirúrgicamente mediante orquidectomía bilateral en machos y ovariectomía bilateral en hembras a las 5-7 semanas de edad, y 4 meses después los animales se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Las hembras controles se sacrificaron en fase *estro* confirmando previamente mediante frotis vaginal. Se confirmó el éxito de la cirugía observando la atrofia de las glándulas seminales en machos y la involución uterina en hembras. Se tomaron los pesos de los animales y el suero para la medición de los niveles sanguíneos de hormonas se obtuvo extrayendo sangre directamente del corazón.

Se extrajo la aorta, a la que se eliminó el tejido conectivo circundante y se mantuvo en solución de Krebs-Henseleit (KHS), en mM: NaCl 115; CaCl<sub>2</sub> 2,5; KCl 4,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub>·7·H<sub>2</sub>O 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25 glucosa 11,1 y Na<sub>2</sub>EDTA 0,03) a 4° C. Esta investigación cumple las directrices de *la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio* publicada por *USA National Institutes of Health* (NIH) (No.85.23, revisada en 1985).

## **II. PRESIÓN ARTERIAL**

La presión sistólica sanguínea se midió durante cinco días de estudio en animales vivos mediante el método de pletismografía de arteria caudal (método de “tail-cuff”) descrito por Buñag (1974) (Letica, Digital Pressure Meter, LE5000, Barcelona).

## **III. NIVELES DE HORMONAS EN PLASMA**

El plasma se obtuvo en el momento de la decapitación extrayendo la sangre del corazón del animal, se centrifugó a 2500xg durante 15 min y los niveles de hormonas fueron

determinados usando un Kit de inmunoensayo enzimático monoclonal (Cayman Chemical, USA). Este kit detecta los niveles de hormonas en 1,4 pg/ml y tiene una precisión de interacción del 5%. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Es un ensayo colorimétrico basado en la competición entre testosterona y un conjugado de testosterona-acetilcolinesterasa para un número limitado de lugares de unión de anisero de conejo específico de testosterona. Este antisuero se une completamente a la anti IgG de conejo monoclonal obtenida en ratón presente en la placa elisa. El producto de esa reacción se determina mediante espectrofotometría a 412 nm y es proporcional a la cantidad de testosterona-acetilcolinesterasa unido a la placa, la cual es inversamente proporcional a la cantidad de testosterona libre y presente en la placa durante la incubación. Los resultados se expresaron en pg/ml.

#### **IV. EXPRESIÓN DE COX-1/2 y eNOS**

##### **IV. a Preparación de las muestras**

Para estudiar la expresión de la COX-1/2 y eNOS y su posible modificación por las hormonas sexuales se empleó la técnica de Western Blot. Para ello, los segmentos arteriales se homogeneizaron a 4° C en 200 µl de buffer de homogeneización (1 mM de vanadato sódico, 1% SDS y 0,01 M Tris-HCl pH 7,4). Se centrifugaron las muestras a 10000xg a 4° C durante 10 min, y el sobrenadante se utilizó para medir el contenido proteico.

Para cuantificar la cantidad de proteína, se cargaron cada una de las muestras homogeneizadas por triplicado en una placa ELISA y se realizó un ensayo colorimétrico (reactivo de Folin y solución alcalina de tartrato sódico). Mediante un lector de placas (Multiskan AFCENT, Kabsystems) y con el programa Ascent Software, se obtuvo una curva patrón a partir de las muestras con concentraciones conocidas de BSA y por la interpolación en dicha curva patrón, se calculó la concentración de proteínas en cada una de las muestras.

Se ajustaron todas las muestras a la concentración menor de proteína obtenida, mediante diluciones con buffer de homogenización y se las añadió buffer de Laemmli (0,01% azul de bromofenol; 100 mM ditiotritol; 0,1% glicerol; 2% SDS y 60 mM Tris-HCl pH 6,8). Las

muestras se llevaron a ebullición durante 10 min y se tomó el volumen necesario para cargar las muestras en el gel de acrilamida (polímero reticulado soluble en agua).

#### **IV.b. Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Con esta técnica, llamada electroforesis, lo que se pretende es desplazar las proteínas aplicándoles un campo eléctrico, donde la velocidad de movimiento de las mismas depende de dos factores: la fuerza ejercida por el campo eléctrico y la fuerza de fricción (resistiéndose al movimiento) que ejerce el entorno de las proteínas, dependiendo de su tamaño.

Una vez montados los geles, se tomó el volumen adecuado para introducir 20 µg de proteínas totales de cada muestra en los pocillos del gel. El gel de separación poseía una concentración de poliacrilamida del 7,5% (p/v) para eNOS y 10% (p/v) para COX1/2 y el gel de concentración una de 5% (p/v). Una vez cargadas las muestras en los pocillos, se conectaron los electrodos, la electroforesis se realizó a un voltaje constante de 97 V en un Mini-PROTEAN 3 CELL (Bio Rad Laboratories).

#### **IV. c. Electrotransferencia y detección inmunológica**

Las muestras ya separadas, se transfirieron electroforéticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Bio Rad Immun-Blot®) con poros de 0,2 µm previamente activada con metanol puro. La transferencia la realizamos en un aparato de transferencia vertical (Mini Trans-Blot, BioRad), utilizando un tampón de transferencia compuesto por Tris HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y metanol 20% (v/v). Como marcador de peso molecular se utilizó SDS-Page broad-rang (Bio-Rad Laboratories).

A continuación y una vez transferidas las muestras se realizó la detección inmunológica:

Para ello se bloqueó la membrana en TBS (100 mM pH 7,4 Tris-HCl, 0,9% p/v NaCl, 0,1% SDS) con leche en polvo desnatada al 5% p/v durante 1 hora. Posteriormente se incubó la membrana durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario:

- policlonal anti-COX-2 (1:200, Cayman Chemical, USA)
- policlonal anti-COX-1 (1:200, Cayman Chemical, USA)
- monoconal anti-eNOS (1:1000, Transduction Laboratories, UK)

Al día siguiente se lavó la membrana con TBS-Tween durante 1 hora y se trató con el anticuerpo secundario conjugado con actividad peroxidasa durante 1,5 horas a temperatura ambiente:

- anti-IgG de conejo (1:1000, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) para COX-2.
- anti-IgG de ratón (1:1000, StressGen Bioreagents, Canadá) para COX-1.
- anti-IgG de ratón (1:1000, StressGen Bioreagents, Canadá) para eNOS.

Para el revelado se utilizó el kit ECL™, siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), mediante auto-radiografía (Hyperfilm ECL, Amersham International Plc).

La misma membrana se utilizó para determinar la expresión de la  $\alpha$ -actina con un anticuerpo monoclonal anti  $\alpha$ -actina (1:3000, Sigma-Aldrich, España) y su contenido se utilizó para corregir la expresión de las enzimas en cada muestra.

El análisis de las bandas obtenidas se realizó mediante el programa Scion Image for Windows (2000 Scion Corporation®).

## V. LIBERACIÓN DE PROSTANOIDES

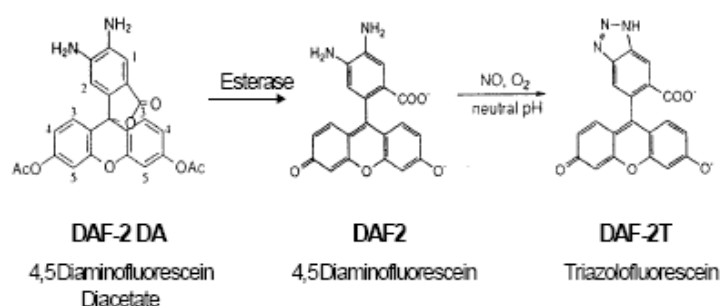
La producción de TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  y PGE<sub>2</sub> *in vivo* se valoró midiendo la producción de sus correspondientes metabolitos TXB<sub>2</sub>, 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , 13,14-dihydro-15-keto PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  y PGE<sub>2</sub> respectivamente utilizando el kit comercial de enzimoimmunoensayo para los respectivos prostanoides (Cayman Chemical). Para ello, segmentos de aorta de ambos grupos de ratas se mantuvieron durante 30 min en 5 ml de KHS a 37° C, burbujeado continuamente con una mezcla de 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub> (periodo de estabilización). Tras varios lavados de 10 min en un baño de 0,2 ml de KHS se recogió el medio para medir la liberación basal de prostanoides. Tras reponer el KHS, se realizó una curva concentración-dependiente a ACh (0,01 nM-10  $\mu$ M) a intervalos de 2 min/concentración, de forma similar

a la realización de las curvas concentración-respuesta descritas en el apartado de reactividad vascular.

Los distintos ensayos se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, las muestras se transfirieron a una placa ELISA recubierta con un anticuerpo de cabra específico contra IgG de conejo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con un anticuerpo de conejo específico contra TXB<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>. Una vez lavada la placa, se añadió una solución de p-nitrofenil fosfato durante 45 min a temperatura ambiente. Tras parar la reacción, la placa se leyó a 405 nm utilizando un lector de placas. Se utilizó un pocillo “blanco” para sustraer la señal de fondo. Los resultados se expresaron en pg prostanoide/ml mg tejido.

## VI. LIBERACIÓN DE NO

La liberación de NO por parte de las arterias se midió utilizando el indicador fluorescente de NO 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA) según el protocolo descrito por Martín y col. (2005). Este compuesto penetra en las células, donde es hidrolizado por las esterasas citosólicas y es transformado en 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2). Ésta a su vez reacciona con el NO para formar el producto fluorescente triazolfuoresceína (DAF-2T), cuantificable mediante la utilización de un filtro de excitación de 492 nm y un filtro de emisión de 515 nm (fig.12).



**Figura 12:** Reacción de la diaminofluoresceína

Para realizar este experimento se mantuvieron las aortas de ambos grupos de animales a la misma tensión (1 g) que se realizaron los experimentos de *Reactividad vascular*. Tras un periodo de estabilización de 45 min en buffer HEPES (en mM: NaCl 119; HEPES 20; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,2; KCl 46; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1; NaHCO<sub>3</sub> 5; glucosa 5,5;

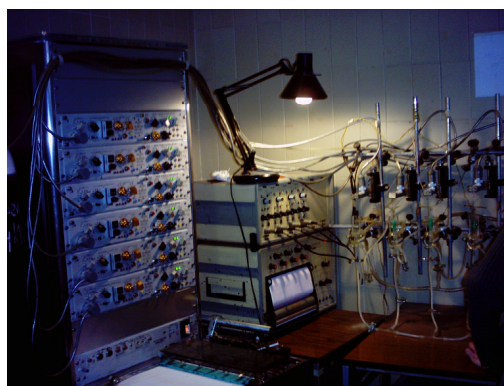
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,15;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4; pH 7,4) a 37°C, las arterias se incubaron con 0,5  $\mu\text{M}$  DAF-2 DA durante 45 min. Se recogió el medio para medir la liberación basal de NO. Una vez el baño fue rellenado, se realizaron curvas concentración-respuesta a ACh (0,1nM-10  $\mu\text{M}$ ) y se recogió el medio para medir la liberación inducida por ACh. La fluorescencia del medio se midió a temperatura ambiente utilizando un espectrofluorímetro (LS50 Perkin Elmer instruments, FL WINLAB Software). Se usó tritón (0,05 %) con el fin de permeabilizar las células endoteliales y detectar el NO producido que se encontraba en su interior. Se obtuvieron medidas de medio sin arteria (blanco) para restar la emisión de fondo.

Para analizar el efecto modulador de prostanoideos derivados de COX-1 y COX-2, se realizaron los ensayos en presencia de los inhibidores específicos de COX-1 y COX-2, SC-560 (50 nM) y NS-398 (10  $\mu\text{M}$ ) respectivamente. Para estudiar el efecto específico de  $\text{PGI}_2$  y de  $\text{TXA}_2$  sobre la liberación de NO, los ensayos se realizaron en presencia de TCP (10  $\mu\text{M}$ ) o de furegrelato (1  $\mu\text{M}$ ).

## VII. REACTIVIDAD VASCULAR

El método utilizado para analizar los cambios en la tensión isométrica de los segmentos arteriales está ampliamente descrito en Nielsen y Owman (1971). Se introdujeron dos alambres finos de acero inoxidable por el lumen del vaso, uno de ellos fijado a la pared del baño de órganos y, el otro, conectado a un transductor de fuerza (Grass FTO3C; Quincy, Mass, USA), conectado a su vez a un polígrafo Grass modelo 7D (fig.13 y 14).

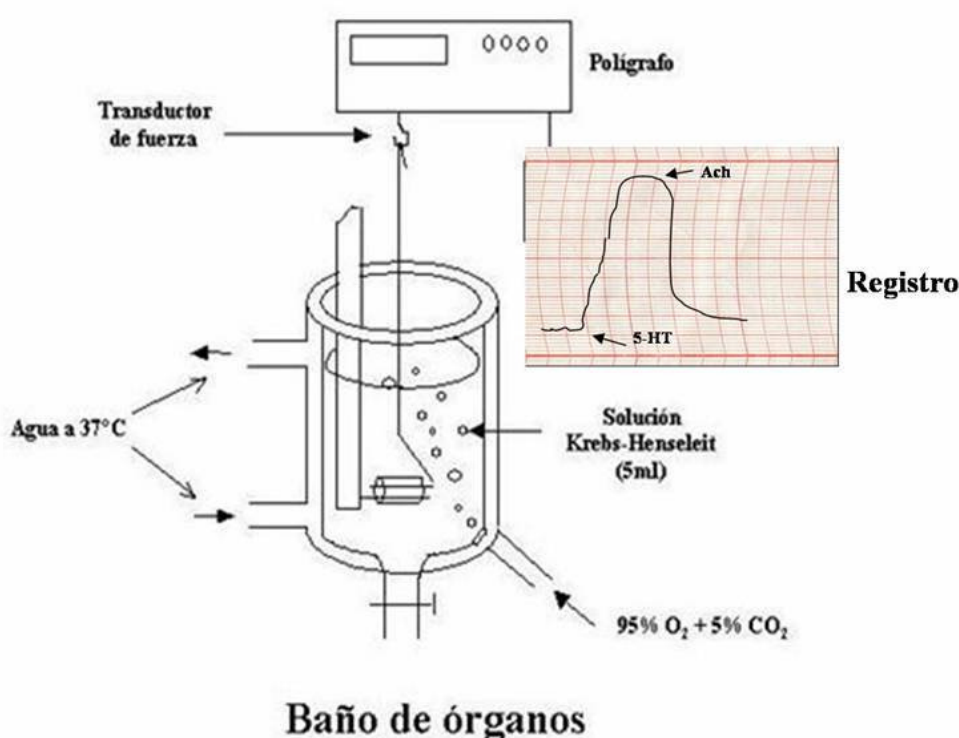
Los segmentos arteriales (de 5mm de longitud) se sumergieron en un baño de órganos con 5ml de KHS a 37° C burbujeado de manera continua con una mezcla al 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$  (pH de 7,4) durante todo el experimento.



**Figura 13:** Baños de órganos y polígrafos Grass modelo 7D y Letica.

A los segmentos arteriales se les aplicó una tensión de 1 g, siendo dicha tensión reajustada cada 15 min durante un total de 90 min (periodo de estabilización). Una vez estables, se comprobó la integridad funcional de todos los segmentos aplicando una solución de KCl 75 mM.

Tras eliminar por completo el KCl y transcurrido un periodo de lavado se analizó la presencia de endotelio. Para ello se aplicó acetilcolina (ACh, 10  $\mu$ M) a segmentos precontraídos con 5-hydroxytryptamina (5-HT, 1  $\mu$ M). Cuando la relajación inducida por la ACh fue superior al 70% del tono obtenido con 5-HT, se consideró con endotelio.



**Figura 14:** Esquema de baño de órganos aislado con un segmento de arteria.

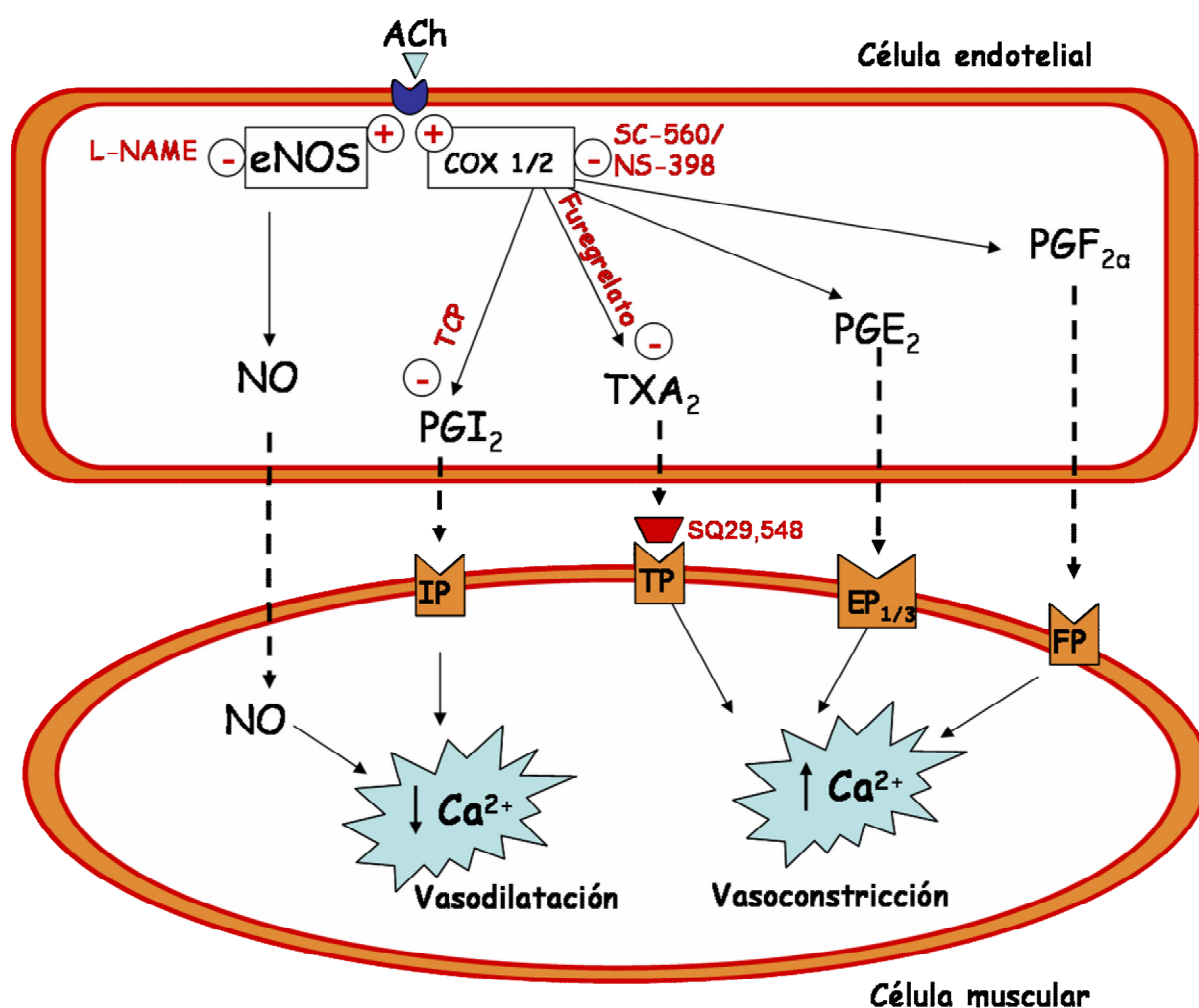
Tras un periodo de lavado, y recuperación del tono basal, se realizaron en ambos grupos curvas concentración-respuesta a ACh (0,1 nM-10  $\mu$ M) en aortas precontraídas con 5-HT procedentes de ratas machos y hembras. En cada segmento arterial sólo se realizó una curva concentración respuesta a ACh.

Con el fin de determinar el posible papel funcional del NO y los prostanoideos en la relajación inducida por ACh, se incubaron segmentos arteriales con L-NAME (0,1 mM, inhibidor de la eNOS) durante 30 min y se realizaron las curvas concentración respuesta a

ACh. Para analizar el papel funcional de los prostanoideos derivados de COX, se incubaron los segmentos arteriales con inhibidores específicos para ambas isoformas de la COX, SC-560 (50 nM, inhibidor de la COX-1) y el NS-398 (10  $\mu$ M, inhibidor de COX-2) (fig.15).

Con el fin de determinar el posible papel funcional del  $\text{TXA}_2$  en la vasorrelajación inducida por ACh, se incubaron algunos segmentos de ambos grupos de animales con furegrelato (1  $\mu$ M, inhibidor específico de la síntesis de  $\text{TXA}_2$ ) y con SQ29,548 (1  $\mu$ M, antagonista de los receptores TP) 30 min antes de realizar la curva concentración-respuesta a ACh. Para investigar el posible papel de la  $\text{PGI}_2$  se incubaron algunos segmentos con tranilcipromina, TCP (10  $\mu$ M, inhibidor específico de la síntesis de  $\text{PGI}_2$ ) (fig.15).

Para investigar las posibles interacciones entre  $\text{TXA}_2$  y  $\text{PGI}_2$  se realizaron curvas concentración respuesta a ACh, en presencia de TCP más furegrelato, o TCP más SQ29,548 (fig.15).



**Figura 15:** Esquema representativo de los distintos inhibidores usados.



Del mismo modo para analizar las posibles diferencias en el efecto vasomotor de los prostanoïdes se analizó la capacidad de inducir vasoconstricción del mimético del TXA<sub>2</sub> (15)-hidroxy-11 $\alpha$ , 9  $\alpha$  -(epoxymethano) prosta-5,13-dienoic acid (U-46619, 0,1 nM - 1  $\mu$ M), de PGE<sub>2</sub> exógena (1 nM - 10  $\mu$ M), PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (1 nM - 1  $\mu$ M) así como la vasodilatación inducida por PGI<sub>2</sub> (0,1 nM - 1  $\mu$ M).

## VIII. SOLUCIONES Y FÁRMACOS

Los reactivos y fármacos utilizados en el experimento de reactividad fueron: ACh hidrocloreuro, 5-HT, TCP, DAF-2, L-NAME hidrocloreuro, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGI<sub>2</sub> y Nitroprusiato sódico y SC-560 (Sigma-Aldrich, España), PGE<sub>2</sub>, Indometacina, y Furegrelato (Cayman Chemical), U-46619 y NS-398 (Calbiochem) y SQ29,548 (Biolink, SL). Todos los fármacos se diluyeron en agua bidestilada excepto formamidina, U-46619, SQ29,548 y PGE<sub>2</sub> que fueron diluidos en etanol y NS-398 y SC-560 en DMSO. Se prepararon soluciones *stock* (10 mM) de todos los fármacos y se almacenaron a -20° C, preparándose las diluciones correspondientes en solución fisiológica de KHS en el momento de su utilización.

## IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La respuesta contráctil inducida por KCl y 5-HT se expresó en mg y las contracciones de U-46619, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  y PGE<sub>2</sub> se expresaron como porcentaje del tono inducido por 75mM de KCl. La respuesta relajadora inducida por ACh o por PGI<sub>2</sub> se expresó como porcentaje de la precontracción inducida por 5-HT, 1  $\mu$ M. Los resultados se indicaron como media  $\pm$  EEM (error estándar de la media). El análisis estadístico se llevó a cabo comparando cada una de las curvas obtenidas en presencia de fármaco con una curva control en ausencia de los mismos utilizando un análisis de la varianza (ANOVA, dos colas). Cuando la ANOVA mostró un efecto significativo del tratamiento, se usó un test de Bonferroni post-hoc para comparar las medias individualmente. La respuesta máxima (valores de E<sub>máx</sub>) y logaritmo de la dosis que produce el 50% de la máxima respuesta a ACh (log EC<sub>50</sub>) fueron calculados mediante un análisis de regresión no lineal de cada curva concentración-respuesta individual usando el software de Graph Pad Prism 4.0 (San Diego, CA). Los resultados de los experimentos de liberación de NO y prostanoïdes se analizaron mediante una *t* de Student para muestras independientes. Se consideraron significativos valores de *p* menores que 0,05.

## **Resultados y Discusión**

## EFFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES MASCULINAS SOBRE:

### I. Niveles de hormonas en sangre, peso corporal y presión arterial.

La concentración de testosterona en plasma de machos castrados se ve reducida en un 91% con respecto a sus controles ( $p<0,001$ ). La orquidectomía disminuyó en un 7% el peso de las ratas con respecto a sus controles ( $p<0,05$ ). Los niveles de presión arterial no se vieron modificados por la privación de hormonas sexuales ( $p>0,05$ ) (tabla 3).

	Control	Orquidectomizado
<b>Niveles de testosterona en plasma (pg/ml)</b>	2404 $\pm$ 323 <sup>a</sup> (5)	220 $\pm$ 49 <sup>b</sup> (5)
<b>Peso del animal (g)</b>	461,6 $\pm$ 8,4 <sup>c</sup> (39)	428,2 $\pm$ 8,1 <sup>d</sup> (23)
<b>Presiones sanguíneas (mm Hg)</b>	139 $\pm$ 5,4 (10)	128 $\pm$ 5,2 (10)

**Tabla 3.** Efecto de la orquidectomía sobre: los niveles de testosterona en plasma, el peso del animal y las presiones sanguíneas. Los valores (media  $\pm$  EEM) el número de animales viene indicado entre paréntesis. a-b  $p<0,0001$ ; c-d  $p<0,05$

Teniendo en cuenta estos resultados, los efectos descritos en este estudio sobre la función vascular no están causados por cambios hemodinámicos, puesto que la orquidectomía no modifica la presión sanguínea; adicionalmente, y puesto que la orquidectomía es la única variable en estos estudios, se podría hipotetizar que los resultados hallados se deben a la disminución de los niveles de testosterona plasmática, aunque no se pueden descartar la participación de otros factores distintos a la testosterona producidos en las gónadas, que pueden jugar un papel importante en la función vascular. Entre estos factores se incluyen alteraciones en la expresión y/o actividad de la aromatasa, el factor endotelial de crecimiento vascular, el factor de crecimiento básico de fibroblastos, el factor de transformación de crecimiento  $\beta$  o hialuronidasa (Lissbrent y col., 2003) los cuales juegan un papel importante en la función vascular (Rahmanian y Heldrin, 2002).

## II. Respuesta contráctil inducida por KCl y 5-HT.

La respuesta contráctil inducida por 75 mM de KCl fue similar en ambos grupos de animales (controles  $1597 \pm 71,44$  mg,  $n=47$ ; orquidectomizados,  $1771 \pm 75$  mg,  $n=43$   $p>0,05$ ) indicando que las hormonas endógenas no parecen modular la respuesta a KCl, como ya había sido publicado en aorta (Tejera y col., 1999). Estos resultados difieren de otros en los que una disminución en la respuesta contráctil ha sido asociada tanto a la pérdida de hormonas sexuales (Golden y col., 2003) como al tratamiento con testosterona (Jones y col., 2004b). En el mismo modelo experimental utilizado en este trabajo, la respuesta inducida por KCl se vio disminuida por la orquidectomía en arteria mesentérica, de modo que la respuesta a este agente vasocontráctil parece también depender del lecho estudiado. Puesto que la contracción del músculo liso vascular depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que está regulada por la entrada de dicho ión a través de distintos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nelson y col., 1990), diferencias en la expresión y/o función de dichos canales en distintos lechos vasculares podrían explicar las diferencias anteriormente descritas. Se ha publicado una disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en arterias coronaria y femoral de conejo por acción de la testosterona (Won y col, 2003).

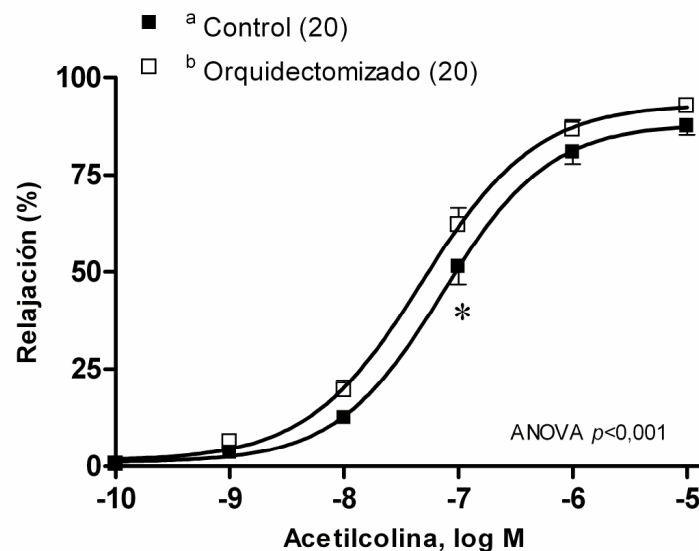
La respuesta contráctil inducida por 1  $\mu\text{M}$  de 5-HT fue similar en ambos grupos de animales (controles  $1176 \pm 103$  mg,  $n=47$ ; orquidectomizados,  $1013 \pm 130$  mg,  $n=43$   $p>0,05$ ). Estos resultados difieren de otras publicaciones en las que atribuyen a la testosterona la capacidad de incrementar la respuesta vasoconstrictora a serotonina en aorta de conejo (Ammar y col., 2004) y arteria coronaria de cerdo (Teoh y col., 2000). Estas diferencias podrían ser debidas a la utilización de testosterona exógena y por tanto los efectos del tratamiento sobre la expresión de receptores serotoninérgicos y/o vías de señalización implicados tras la activación del receptor pueden ser distintos.

Uno de los mecanismos propuestos de interacción entre los andrógenos y la función vascular es a nivel de las células endoteliales. Se sabe que las células endoteliales poseen receptores de andrógenos (Beato y Klug, 2000; Liu y Dillon, 2002) cuya activación modifica distintas vías de señalización intracelular, entre ellas la del NO. Se ha descrito que la activación de receptores androgénicos incrementa la liberación de NO endotelial (Chou y col., 1996), aunque también existen publicaciones en las que se postula que esa modificación en la liberación del NO puede no estar mediada por receptores androgénicos

(Simoncini y col., 2003). Sin embargo, el efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre la síntesis y función de los prostanoïdes ha sido comparativamente menos explorado. El NO endotelial y los prostanoïdes vasoconstrictores y vasodilatadores juegan un papel crucial en la protección del sistema cardiovascular a través de sus efectos reguladores en la agregación plaquetaria, el estrés oxidativo, la adherencia leucocitaria y la proliferación de células musculares lisas, en definitiva modulando el tono vascular (Nasem, 2005, Bachschmid y col., 2005). Teniendo en cuenta que la ACh es capaz de inducir la formación de NO y prostanoïdes (Mitchell y col., 1992; Schulz y col., 1992), se estudió la influencia de las hormonas sexuales sobre la participación del NO y prostanoïdes en la respuesta inducida por ACh.

### III. Respuesta vasodilatadora inducida por ACh

La respuesta vasodilatadora a ACh (0,1 nM -10  $\mu$ M) en aortas precontraídas con 5-HT (1  $\mu$ M) fue mayor en machos castrados que en el grupo control ( $p<0,05$ ) como ya había sido publicado (Ferrer y col., 1999) (fig.16).



**Figura 16:** Vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM -10  $\mu$ M) en segmentos de aorta de ratas control y orquitectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción con 5-HT 1  $\mu$ M (controles  $1176 \pm 103$  mg; castrados  $1013 \pm 130$  mg). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis. \* $p<0,05$  frente a su correspondiente control.

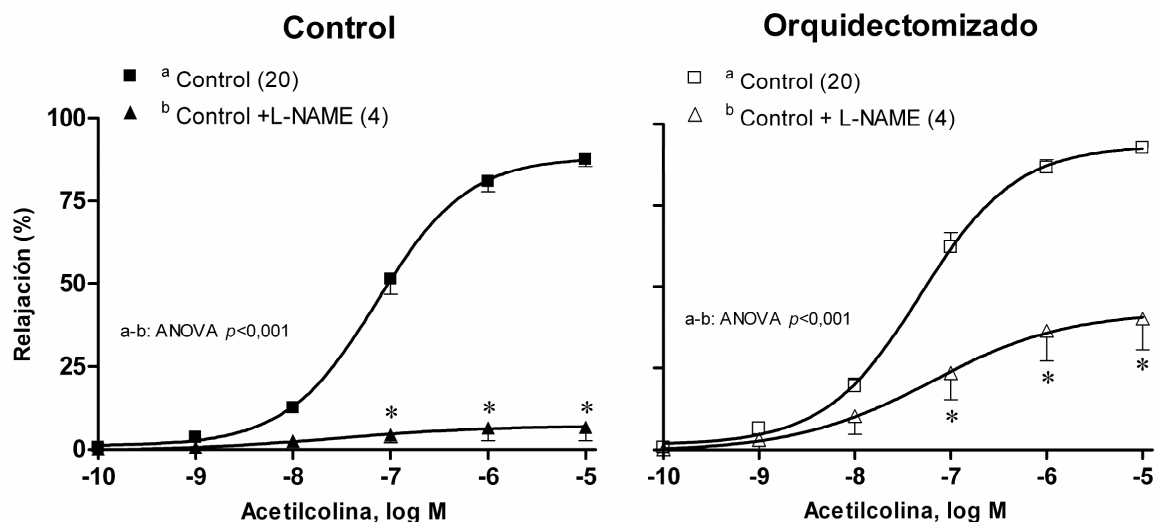
Esta mayor relajación es debida a una mayor producción de aniones superóxido en aortas de animales castrados que inducen relajación mediante activación de canales  $K_{Ca}$  (Ferrer y col., 1999). También hay que señalar que el efecto de las hormonas sexuales depende del lecho vascular estudiado, ya que en la arteria mesentérica la orquidectomía disminuye la relajación inducida por ACh (Blanco-Rivero y col., 2007a).

Teniendo en cuenta que la ACh es un potente activador de la NOS endotelial se estudió la participación del NO en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh en aortas de ratas macho controles y castradas.

### III.a. Participación del NO endotelial

Con el fin de analizar la implicación del NO endotelial en la respuesta a ACh segmentos de ambos grupos de animales se incubaron con L-NAME, inhibidor de la NOS.

La preincubación con L-NAME, dicho fármaco abolió la respuesta a ACh en machos controles de lo que se deduce que la respuesta vasorelajadora a ACh es debida principalmente al NO. Sin embargo, la incubación con L-NAME en segmentos de animales castrados sólo redujo la respuesta a ACh (fig.17, tabla 4).



**Figura 17:** Efecto de 0,1 mM de L-NAME sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM -10  $\mu$ M) en segmentos de aorta de ratas machos control y castrados. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción con 5-HT 1  $\mu$ M (controles 1176  $\pm$  103 mg; controles + L-NAME 1350  $\pm$  25 mg; castrados 1013  $\pm$  130 mg; castrados + L-NAME 1121  $\pm$  59 mg). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis. \* $p$ <0,001 frente a su correspondiente control.

**Tabla 4.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log  $EC_{50}$  a ACh en aorta de ratas control y orquitectomizadas.

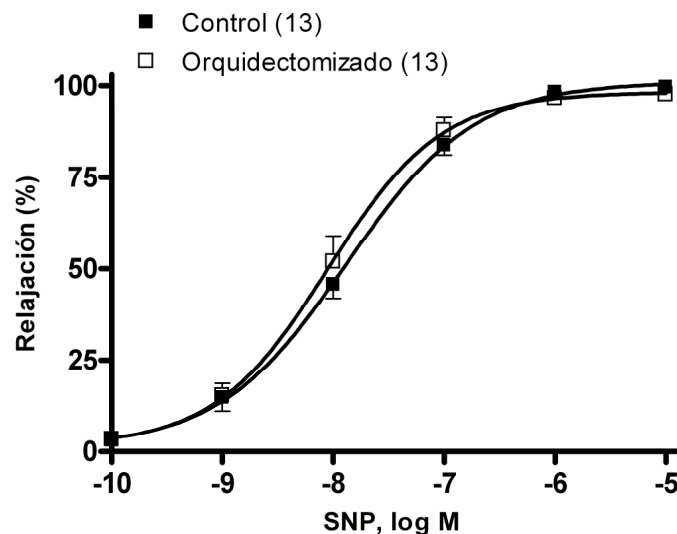
	Control		Orquitectomizado	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b>Control</b>	$88,15 \pm 2,5$	$-7,14 \pm 0,06$	$93 \pm 2,67 *$	$-7,3 \pm 0,07 *$
<b>L-NAME</b>	$7,06 \pm 3,8 ^{\#}$	$-7,54 \pm 1,40 ^{\#}$	$46,52 \pm 15,3 ^{\#}$	$-7,21 \pm 0,74$

\*  $p < 0,05$  vs ratas control;  $^+ p < 0,01$  vs condición control en ratas control;  $^{\#} p < 0,001$  vs condición control en ratas orquitectomizadas.

Estos resultados sugieren que la formación de NO en estos segmentos podría ser menor que en los de animales controles, tal vez por alteraciones en la expresión de la eNOS, a pesar de que la respuesta vasodilatadora en situación control sea mayor. Otra posibilidad que explicaría las diferencias en la relajación a ACh es que la sensibilidad a este agente vasodilatador (NO) se vea alterada por la orquitectomía, con lo que todos estos factores serán evaluados a continuación.

#### Reactividad vascular al Nitroprusiato sódico (SNP)

Por lo tanto, el siguiente paso consistió en determinar posibles cambios en la sensibilidad del músculo liso vascular al NO liberado. Para ello se realizaron curvas a SNP (0,1 nM -10  $\mu$ M), donante de NO, obteniendo que en segmentos aórticos precontraídos con 1  $\mu$ M de 5-HT, el SNP indujo una relajación dependiente de concentración sin diferencias entre machos orquitectomizados y controles (fig.18, tabla 5).



**Figura 18:** Efecto vasodilatador de SNP (0,1 nM-10  $\mu$ M) en aorta de ratas control y orquitectomizadas. Los resultados (medias  $\pm$  EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por 1  $\mu$ M de 5-HT (control,  $1417 \pm 130$ ; orquitectomizados,  $1198 \pm 138$  mg). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

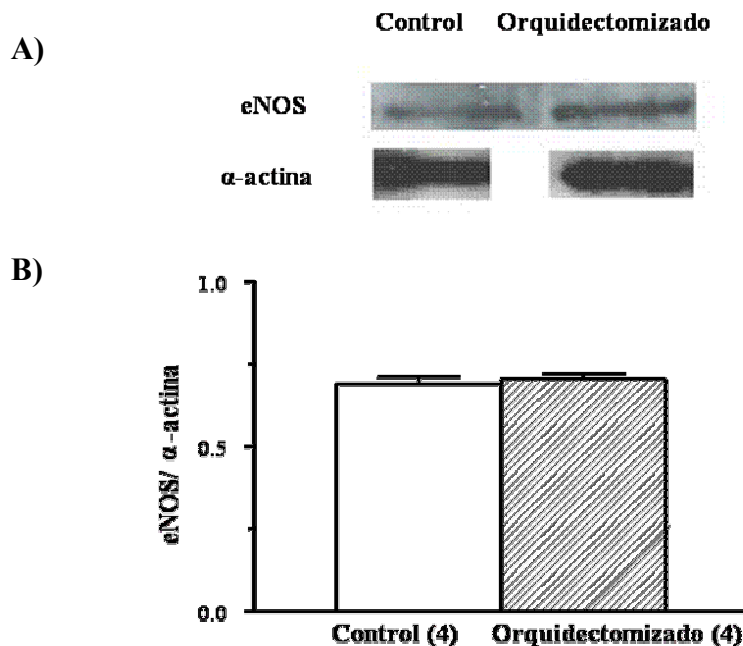
**Tabla 5.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log  $EC_{50}$  a SNP en aorta de ratas control y orquitectomizadas.

	Control		Orquitectomizado	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
SNP	101,1 $\pm$ 2,3	-7,88 $\pm$ 0,07	98,26 $\pm$ 2,9	-8,05 $\pm$ 0,09

Estos resultados concuerdan con lo publicado anteriormente en aorta dónde la pérdida de hormonas sexuales masculinas no afecta a la sensibilidad del músculo liso vascular al NO (Ferrer y col., 1999; Blanco-Rivero y col., 2006b) y en arteria mesentérica (Blanco-Rivero y col., 2007a). El hecho de que la respuesta a SNP, sea similar en segmentos de animales controles y castrados sugiere que el incremento de la respuesta a ACh en animales orquitectomizados no es debido al incremento de la sensibilidad del músculo liso vascular al NO.

#### Expresión de la eNOS

Puesto que el efecto vasodilatador está mediado en parte por el NO endotelial, se analizó si la expresión de eNOS se veía modificada por la gonadectomía, observándose que fue similar en arterias de machos control y orquitectomizados (fig.19) como ya se había publicado en aorta (Blanco-Rivero y col., 2006b) y en arteria mesentérica (Blanco-Rivero y col., 2007a).



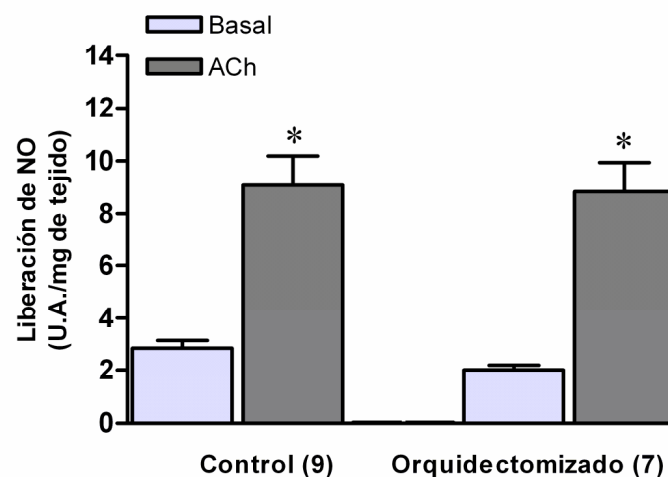
**Figura 19:** Western blot representativo de la expresión de eNOS en segmentos de aorta de ratas control y orquitectomizadas (A). La figura es representativa de cuatro segmentos separados de cada grupo de animales. El panel B muestra el análisis densitométrico de la expresión de eNOS. Los resultados (medias  $\pm$  EEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para eNOS y la obtenida para la  $\alpha$ -actina.



En lo que se refiere a la influencia de los andrógenos sobre la expresión de eNOS, se ha descrito que ésta puede verse incrementada (Liu y Dillon, 2002; Simoncini y col., 2003), disminuida (Chatrath y col., 2003; Mukherjee y col., 2001b) o no modificada (Blanco-Rivero y col., 2006a; Gonzales y col., 2004). Estos resultados indican que las hormonas sexuales masculinas actúan de manera diferente dependiendo del tejido.

#### Liberación de NO inducida por ACh

Teniendo en cuenta que la sensibilidad al NO es la misma y que no existen cambios en la expresión de la eNOS, se analizó la posibilidad de que la liberación de NO inducido por ACh estuviera modificada por la orquidectomía. Se observó que la liberación basal de NO no fue modificada por la orquidectomía. La aplicación de ACh incrementó la liberación de NO de forma similar en aortas de ratas control y orquidectomizadas ( $p < 0,05$ ) (fig.20).



**Figura 20:** Efecto de la gonadectomía sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y estimulada por ACh (0,1 nM -10  $\mu$ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia arbitrarias (U.A.) frente a mg de tejido. \*  $p < 0,05$  frente a la liberación basal de NO.

En resumen, la orquidectomía no modifica la respuesta al SNP, ni la expresión de eNOS, ni la liberación de NO. Es importante señalar que aunque la respuesta vasodilatadora remanente en presencia de L-NAME sea debida al efecto vasodilatador de los aniones superóxido (Ferrer y col., 1999), la participación de sustancias vasoconstrictoras no se puede descartar.

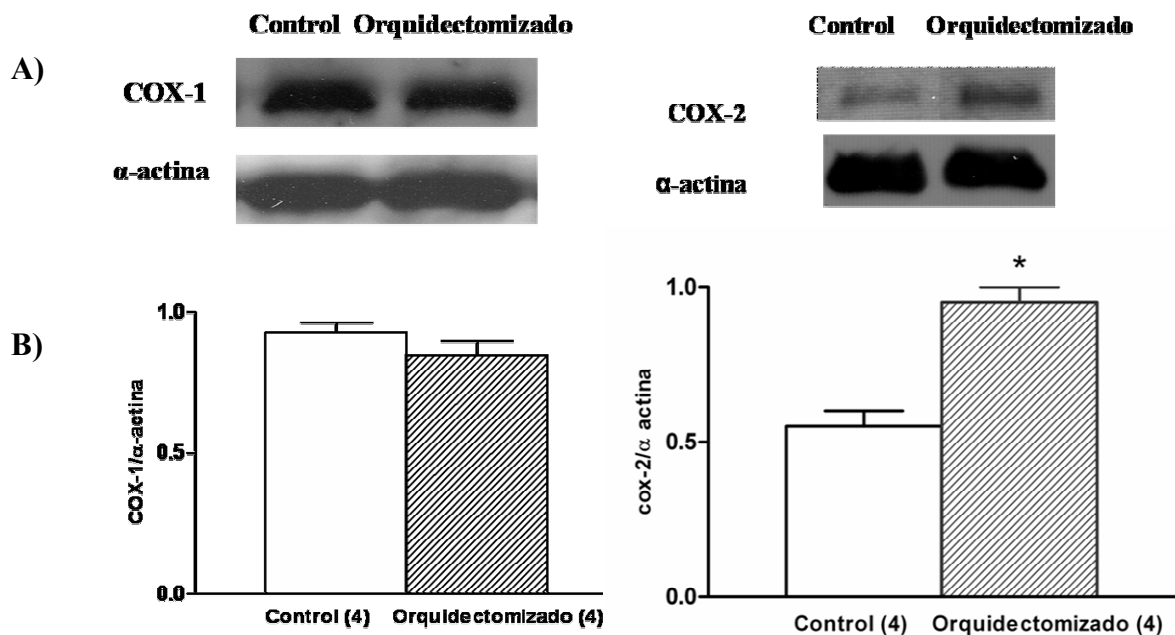
#### **III.b. Participación de prostanoïdes**

Las células endoteliales además del NO liberan prostanoïdes vasoconstrictores y vasodilatadores que contribuyen a la modulación el tono vascular (Henrion y col., 1997;

Ferrer y Osol, 1994; Briones y col., 2002). Puesto que las ROS pueden activar COX-2 (Feng y col., 1995; Kulmacz y Wang, 1995) y teniendo en cuenta que en nuestro modelo experimental la orquidectomía producía un incremento en la formación de aniones superóxido tanto en aorta (Blanco-Rivero y col., 2006b) como en mesentérica (Martín y col., 2005), es posible especular que los andrógenos sean capaces de modular la liberación y/o función de los prostanoideos; sin embargo, existe controversia sobre el efecto específico de las hormonas sexuales masculinas endógenas. Puesto que los prostanoideos se originan a partir de COX-1 y COX-2, se analizó la implicación de derivados de estas enzimas en la respuesta inducida por la ACh, la expresión de COX-1 y COX-2 y la liberación de los prostanoideos inducida por ACh.

#### Expresión de la COX-1 y COX-2

COX-1 y COX-2 son dos isoformas de la ciclooxigenasa codificadas por distintos genes (Kosaka y col., 1994). COX-1 es la isoforma constitutiva y está presente en diversos tipos celulares (Smith y Dewitt, 1996). COX-2 es una isoforma inducible en procesos inflamatorios (Parente y Perreti, 2003), aunque también se expresa constitutivamente en algunos tejidos como el vascular. Nuestros resultados muestran que la orquidectomía no modifica la expresión de COX-1 mientras que incrementa la de COX-2 (fig.21).



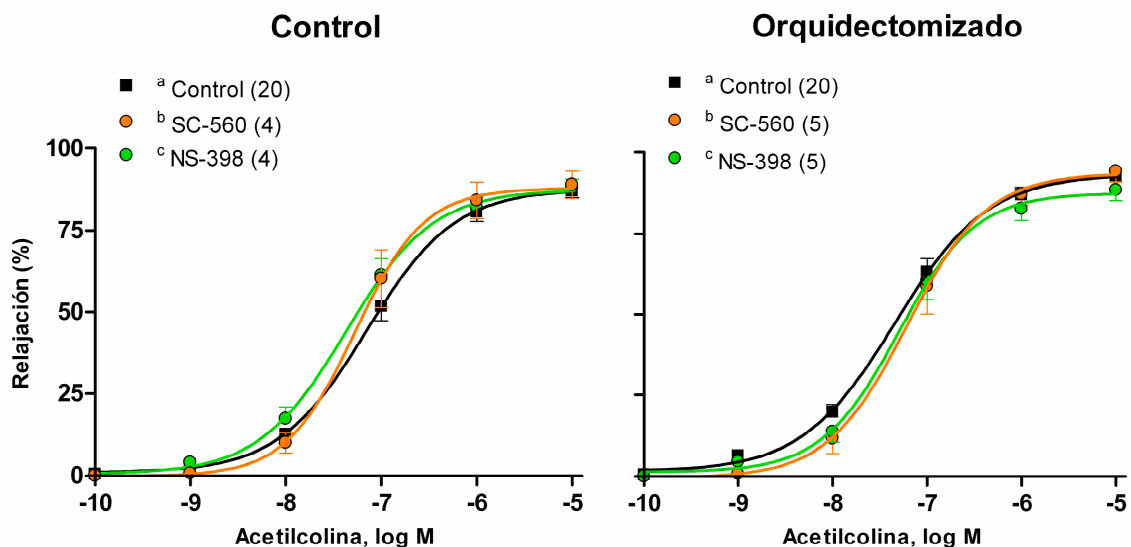
**Figura 21:** Western blot representativos de la expresión de COX-1 y COX-2 en segmentos de aorta de ratas control y orquidectomizadas (A). La figura es representativa de cuatro segmentos separados de cada grupo de animales. El panel B muestra el análisis densitométrico de la expresión de COX-1/2. Los resultados (medias  $\pm$  EEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para COX-1/2 y la obtenida para la  $\alpha$ -actina. \* $p < 0,05$  frente a su correspondiente control.

El resultado acerca de COX-1 está de acuerdo con lo publicado en arterias cerebrales de ratas machos castrados donde la expresión de COX-1 no varía (Gonzales y col., 2004).

El resultado sobre COX-2 contrasta con lo observado en arteria mesentérica donde la orquidectomía no produjo diferencias en la expresión de COX-2 (Blanco-Rivero y col., 2006a) (fig.21). Sin embargo, se ha descrito que la disminución de testosterona relacionada con la edad, aumenta la actividad de la COX-2 en diferentes tejidos (Stewart y col., 2000; Chung y col., 2001), indicando que las hormonas sexuales masculinas endógenas actúan de forma diferente en función del lecho estudiado. Estos resultados podrían explicarse a través del incremento de la producción de aniones superóxido en arterias de animales castrados (Blanco-Rivero y col., 2006b), los cuales podrían potenciar la expresión de COX-2 (Feng y col., 1995; Kulmacz y Wang, 1995). De este modo nuestros resultados muestran que en aorta de ratas orquidectomizadas, los derivados de COX-2 pueden verse incrementados y jugar un papel relevante en la regulación de la función vascular.

#### Participación de COX-1 y COX-2 en la respuesta inducida por ACh

Puesto que los prostanoideos se originan a partir de la activación de COX, con el fin de analizar la implicación de los derivados de esta enzima en la respuesta a ACh, se realizaron curvas a ACh en presencia de inhibidores de la COX. Se analizó el efecto del inhibidor específico de COX-1, SC-560, y del inhibidor específico de COX-2, NS-398, en la respuesta a ACh. La preincubación con SC-560 o NS-398 no produjo diferencias en la relajación a ACh en aortas de ningún grupo de animales (fig.22, tabla 6).



**Figura 22:** Efecto del SC-560 (50 nM) y el NS-398 (10  $\mu$ M) sobre las curvas concentración-respuesta a ACh (0,1 nM -10  $\mu$ M) en segmentos precontraídos con 5-HT de machos control y orquidectomizados. Los resultados (medias  $\pm$  EEM) se expresaron como inhibición de la contracción producida por 1 $\mu$ M de 5-HT (control, 1176  $\pm$  103 mg; control + SC-560, 731  $\pm$  61 mg; control + NS-398, 807  $\pm$  69 mg; castrados 1013  $\pm$  130 mg; castrados + SC-560, 830  $\pm$  87 mg; castrados + NS-398 749  $\pm$  39 mg). El número de animales se indicó entre paréntesis.

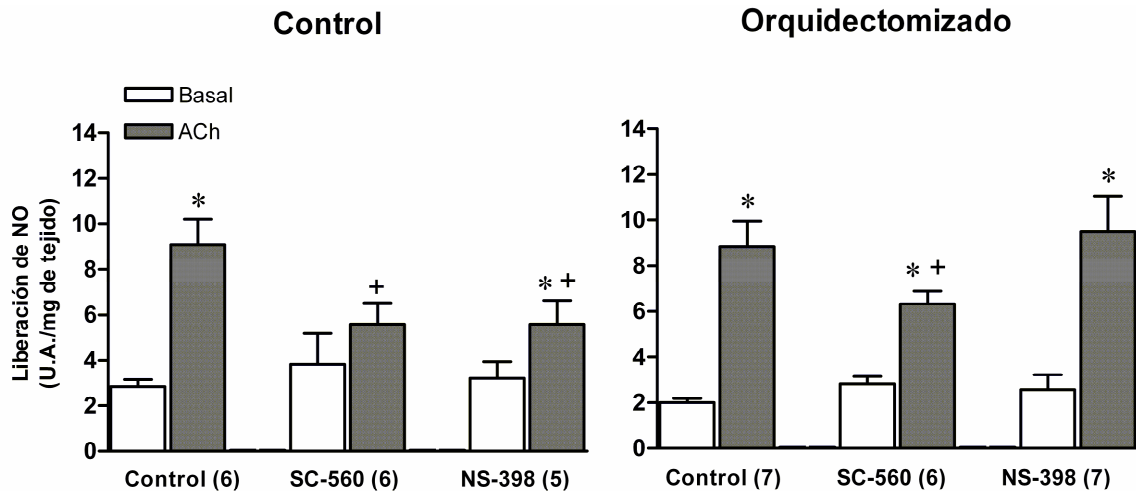
**Tabla 6.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log  $EC_{50}$  a ACh en aorta de ratas control y orquidectomizadas.

	Control		Orquidectomizado	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b>Control</b>	88,15 ± 2,5	-7,14 ± 0,06	93 ± 2,67	-7,3 ± 0,07
<b>SC-560</b>	88,08 ± 3,6	-7,27 ± 0,1	93,68 ± 3,9	-7,21 ± 0,09
<b>NS-398</b>	87,65 ± 2,7	-7,36 ± 0,08	87,74 ± 2,8	-7,3 ± 0,08

Estos resultados aparentemente indicarían que los derivados de COX-1 y COX-2 no participan en la respuesta a ACh. Sin embargo, puesto que se ha publicado recientemente que inhibidores de COX-2 amplifican la señalización NO/GMPc inhibiendo la fosfodiesterasa (Klein y col., 2007), nos permite especular que las hormonas sexuales masculinas podrían regular la contribución de diferentes prostanoïdes en la respuesta mediada por ACh. También podría indicar una inhibición de la síntesis tanto de factores vasodilatadores como vasoconstrictores produciendo un efecto neto nulo porque existiera un balance entre ambos. Por otra parte, se ha propuesto el incremento de los niveles de COX-1 debidos a la inhibición de COX-2 como mecanismo compensatorio (Wang y col., 2004), ya que cuando las células endoteliales son expuestas a un inhibidor selectivo de COX-2 se siguen produciendo prostanoïdes. También existe la posibilidad de que la inhibición de COX-1/2 produzca alteraciones en la síntesis de NO, de forma similar a como el NO regula la síntesis de prostanoïdes (Mollace y col., 2005) por lo que se estudió la participación de COX-1 y COX-2 en la liberación de NO inducida por ACh.

#### Participación de productos derivados de COX en la liberación de NO inducida por ACh

Puesto que se ha descrito que el NO regula la liberación de factores derivados de COX (Mollace y col., 2005), se analizó la posibilidad de que la regulación tuviera lugar a la inversa, por lo tanto se estudió el papel de las isoformas de COX en la liberación de NO inducida por ACh. El inhibidor de COX-1, SC-560, produjo una disminución en la liberación del NO en ambos grupos de animales (fig.23), indicando que el efecto de COX-1 sobre la liberación de NO no parece estar regulado por las hormonas sexuales, y sugiere la existencia de otros mecanismos que compensarían la disminución de NO, en la respuesta vasodilatadora a ACh.



**Figura 23:** Efecto del NS-398 (10  $\mu$ M) y SC-560 (50 nM) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y estimulada por ACh (0,1 nM -10  $\mu$ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. \*  $p < 0,05$  frente a la liberación basal de NO; +  $p < 0,05$  frente a su correspondiente control.

La incubación con NS-398, inhibidor de COX-2 produjo una disminución de la liberación del NO en animales controles mientras que no la modificó en arterias de animales castrados (fig.23) mostrando que las hormonas sexuales regulan el efecto de COX-2 sobre la liberación de NO. Adicionalmente sugieren que pudieran existir diferencias entre controles y castrados en la formación de segundos mensajeros inducidos por derivados de COX-2 que podrían modular la actividad de la eNOS.

Así prostanoideos derivados de COX-2, como la PGI<sub>2</sub> podrían modular la actividad de la eNOS a través de la formación de AMPc y subsiguiente activación de PKA como se ha observado en otras cepas de rata (Ferrer y col., 2004). Estos resultados nos permiten especular que, a pesar de que la respuesta a ACh no se vea modificada por la inhibición de COX-2, las hormonas sexuales masculinas podrían regular la participación de diferentes prostanoideos en dicha respuesta.

Por tanto, el siguiente paso consistió en estudiar la participación de los distintos prostanoideos derivados de COX-2, en respuesta a ACh, en presencia y ausencia de las hormonas sexuales.

### III.b1. Participación del TXA<sub>2</sub> en la respuesta inducida por la ACh.

Se sabe que el TXA<sub>2</sub> es uno de los prostanoideos vasoconstrictores más importantes producido por la pared vascular que participa en la disfunción endotelial asociada a diferentes factores de riesgo cardiovascular (Shimokawa, 1998; Nie y col. 2000). Muchos

de los estudios que analizan la influencia de los andrógenos sobre los efectos vasculares del TXA<sub>2</sub> han sido enfocados a describir su acción sobre los receptores TP así como en la respuesta contráctil inducida por análogos del TXA<sub>2</sub>. Así, se ha descrito que la testosterona incrementa la densidad de los receptores TP en plaquetas (Matsuda y col., 1994; Ajayi y col., 2005) y en cultivos de células musculares de aorta de rata (Matsuda y col., 1995; Higashiura y col., 1997). Sin embargo, son muy escasos los estudios que analizan la influencia de las hormonas sexuales endógenas en la participación del TXA<sub>2</sub> en distintas respuestas vasculares.

Por tanto, se analizó el posible papel funcional del TXA<sub>2</sub> en la respuesta a ACh en nuestro modelo experimental. Se realizaron curvas de ACh en presencia de furegrelato, inhibidor específico de la síntesis del TXA<sub>2</sub> o de SQ29,548, antagonista del receptor TP.

Cuando se analizó el efecto del furegrelato y del SQ29,548 en la relajación a ACh se observó que ninguno de los dos fármacos modificaba dicha respuesta en las arterias de animales controles, indicando que el TXA<sub>2</sub> no participa en la respuesta a ACh, de acuerdo con estudios realizados en aortas de diferentes cepas de rata (Rapoport y Williams, 1996; Gluais y col., 2005b) (fig.24, tabla 7). Sin embargo, en arterias de ratas orquidectomizadas el furegrelato incrementó la respuesta vasodilatadora a ACh, indicando un papel funcional del TXA<sub>2</sub> ( $p < 0,0001$ ). Estos resultados podrían ser debidos a diferencias en la sensibilidad del músculo liso al TXA<sub>2</sub> o a un incremento en la síntesis del mismo.



**Figura 24:** Efecto del furegrelato (1  $\mu$ M) y SQ29,548 (10  $\mu$ M) sobre las curvas concentración-respuesta inducidas por ACh (0,1 nM -10  $\mu$ M) en segmentos de aorta de ratas control y orquidectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción con 5-HT 1  $\mu$ M (controles 1142  $\pm$  129 mg; controles + furegrelato 1124  $\pm$  98 mg; controles + SQ29,458 1385  $\pm$  128 mg; castrados 1073  $\pm$  278 mg; castrados + furegrelato 830  $\pm$  77 mg; castrados + SQ29,458 1270  $\pm$  172 mg,  $p > 0,05$ ). El número de animales está indicado entre paréntesis. \* $p < 0,05$  frente a su correspondiente control.

**Tabla 7.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log  $EC_{50}$  a ACh en aorta de ratas control y orquidectomizadas.

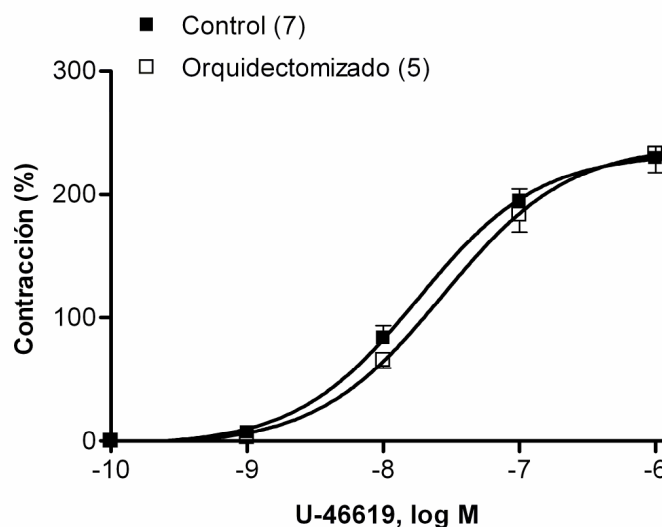
	Control		Orquidectomizado	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b>Control</b>	88,15 ± 2,5	-7,14 ± 0,06	93 ± 2,67 *	-7,3 ± 0,07 *
<b>Furegrelato</b>	92,95 ± 5,7	-7,14 ± 0,14	100 ± 3,99	-7,59 ± 0,11 # *
<b>SQ29,548</b>	92,89 ± 8,5	-7,08 ± 0,21	97,28 ± 3,96	-7,09 ± 0,09

\*  $p < 0,05$  vs control rats; #  $p < 0,01$  vs condición control en ratas orquidectomizadas.

Es importante tener en cuenta que la incubación con SQ29,548 no afectó a la respuesta a ACh (fig.24), lo que parece contradecir los resultados obtenidos con el furegrelato. Sin embargo, puesto que se han descrito múltiples interacciones entre los distintos prostanoïdes (Cheng y col., 2002; Bachschmid y col., 2005), se puede hipotetizar que cuando se inhibe la síntesis del  $TXA_2$  se podría alterar tanto la producción de otros prostanoïdes que contrarresten el efecto vasomotor del  $TXA_2$  como la liberación del NO. Por tanto, estas hipótesis se analizaron a continuación.

#### Reactividad vascular al $TXA_2$

Para estudiar la posible variación en la sensibilidad al  $TXA_2$ , se realizaron curvas concentración-respuesta al mimético del  $TXA_2$ , U-46619 (0,1 nM- 1  $\mu$ M), su aplicación indujo una contracción dependiente de concentración sin diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (fig.25). Los valores de  $E_{max}$  y log  $EC_{50}$  se incluye en la tabla 8 .



**Figura 25:** Curvas concentración-respuesta al mimético del  $TXA_2$ , U-46619 en aortas de ratas control y orquidectomizadas. Los resultados (media ± EEM) están expresados en porcentaje de la contracción de KCl 75mM (control, 1512 ± 98 mg; orquidectomizado, 1518 ± 63 mg). El número de animales está indicado entre paréntesis.

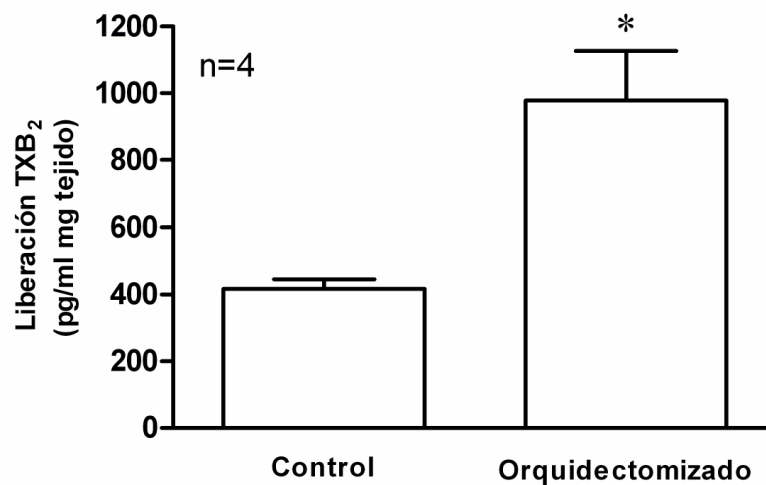
**Tabla 8.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de contracción) y el log  $EC_{50}$  a U-46619 en aorta de ratas control y orquitectomizadas.

	Control		Orquitectomizado	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b>U-46619</b>	$213,1 \pm 6,4$	$-7,74 \pm 0,05$	$226,6 \pm 13$	$-7,57 \pm 0,1$

Estos resultados demuestran que la sensibilidad al  $TXA_2$  no se ve modificada por orquitectomía, lo que concuerda con lo descrito en arterias cerebrales (Gonzales y col., 2005) y mesentéricas (Blanco-Rivero y col., 2006a) de rata. Sin embargo, no coincide con lo publicado por Matsuda y col. en 1994, dónde el tratamiento con testosterona durante dos semanas, incrementaba la contracción inducida por U-46619 en aortas de rata. Estas discrepancias pueden ser debidas a la diferencia de cepas empleadas, edad del animal de experimentación y, lo que es más importante, al tratamiento con testosterona exógena.

#### Liberación de $TXA_2$ inducida por ACh

Para analizar las posibles diferencias en la producción de  $TXA_2$  en respuesta a ACh en animales control y orquitectomizados, se midió la producción de  $TXB_2$ , metabolito estable de  $TXA_2$  inducida por ACh (0,1 nM – 10  $\mu$ M). Los resultados obtenidos muestran una mayor formación de  $TXB_2$  en animales orquitectomizados (fig.26).



**Figura 26:** Liberación de  $TXB_2$  inducido por ACh (0,1 nM – 10  $\mu$ M) en aorta de ratas control y orquitectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresaron como pg  $TXB_2$ /ml mg tejido. Siendo n el número de animales. \*\* $p < 0,01$  frente su control.



Estos resultados concuerdan con datos obtenidos en mesentérica tras estimulación con ACh (Blanco-Rivero y col., 2007a) y con el agonista  $\alpha$ -adrenérgico clonidina (Blanco-Rivero y col., 2006a), en los que la formación de TXB<sub>2</sub> se ve también incrementada en arterias de animales orquidectomizados. En este sentido, se ha publicado que la administración de testosterona en células endoteliales de aorta de ratas macho reduce notablemente la liberación de TXA<sub>2</sub> (Myers y col., 1996) mostrando que la liberación de este prostanoide está regulada hormonalmente.

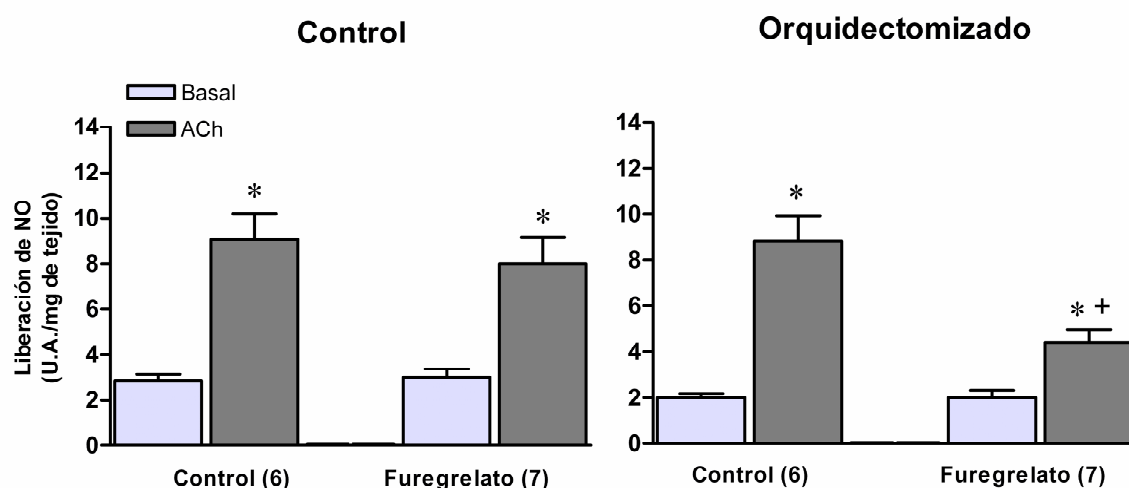
Estos datos estarían de acuerdo con la hipótesis de que el incremento de aniones superóxido producido en ausencia de hormonas sexuales masculinas podría activar la PKC (Blanco-Rivero y col., 2006b) que incrementaría la actividad de la COX en arteria mesentérica de estos mismos animales.

Por otro lado, a través del peroxinitrito formado al reaccionar el O<sub>2</sub><sup>-</sup> con el NO, que aumenta la actividad de la COX (Kulmacz y Wang, 1995), también podríamos explicar la mayor producción de TXA<sub>2</sub> en machos castrados.

Adicionalmente, y de forma independiente a la acción de los andrógenos, nuestros datos también estarían de acuerdo con lo sugerido por Bachschmid y col. que defienden que la síntesis de prostanoideos está regulada por el estado redox de la célula, de modo que diferentes especies reactivas de oxígeno inhiben la formación de prostanoideos vasodilatadores, mientras que incrementa la producción de prostanoideos vasoconstrictores (Bachschmid y col., 2005).

#### Participación del TXA<sub>2</sub> en la liberación de NO endotelial.

Con el fin de analizar si la inhibición de la síntesis de TXA<sub>2</sub> modificaba la liberación de NO, ésta se midió en presencia de furegrelato, tanto en arterias de animales controles como de castrados. La incubación con furegrelato no modificó la liberación de NO en el grupo control (fig.27). Sin embargo, en animales orquidectomizados la incubación con furegrelato disminuyó la síntesis de NO, indicando que al disminuir la síntesis de TXA<sub>2</sub> se reduce también la de un vasodilatador como el NO (fig.27).



**Figura 27:** Efecto del furegrelato (1  $\mu$ M) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y la estimulada con ACh (0,1 nM – 10  $\mu$ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. \*  $p < 0,05$  frente a la liberación basal de NO; +  $p < 0,01$  frente a su correspondiente control.

Estos resultados indicarían que en aortas de ratas castradas el  $\text{TXA}_2$  endógeno está modulando positivamente la liberación de NO.

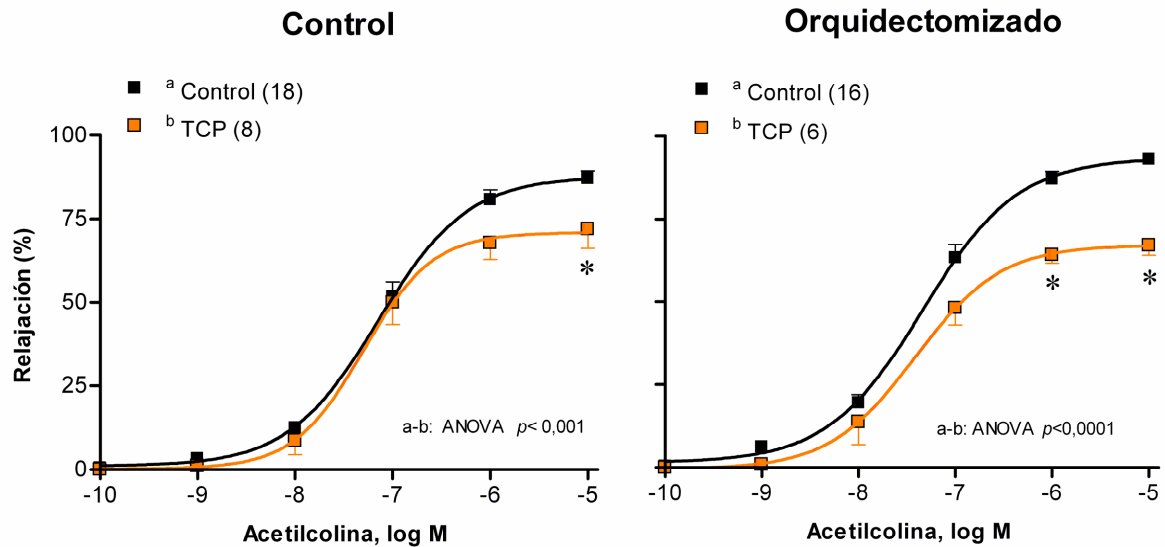
Actualmente, la interacción entre prostanoides y NO está siendo objeto de estudio (Mollace y col., 2005). De hecho, en plaquetas está descrito el detrimento de la actividad de la NOS inducida por inhibidores de la COX siendo responsables la inhibición del  $\text{TXA}_2$  y la reducción de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Chen y col., 1997).

En nuestras condiciones experimentales, a pesar de que la síntesis de NO se ve disminuida en presencia de furegrelato en animales orquidectomizados, la relajación a ACh es mayor, por lo que se investigó el papel de otros prostanoides implicados en esta respuesta y su interacción con el  $\text{TXA}_2$ .

### III.b2. Participación de $\text{PGI}_2$ en la respuesta inducida por la ACh.

En los vasos sanguíneos, la PGI sintasa es la responsable de la producción de  $\text{PGI}_2$  (Vane y col., 1998), vasodilatadora y antiagregante (Higgs y Moncada, 1983) y sus niveles se ven aumentados en aterosclerosis (Fitzgerald y col., 1987), e hipertensión (Blanco-Rivero y col., 2005b).

El inhibidor de la síntesis de  $\text{PGI}_2$ , TCP (10  $\mu$ M), disminuyó la respuesta vasodilatadora a ACh en mayor medida en las arterias de ratas orquidectomizadas que en controles (fig.28). Los valores de  $E_{max}$  y  $\log EC_{50}$  se incluyen en la tabla 9.



**Figura 28:** Efecto del TCP (10  $\mu$ M) sobre las curvas concentración-respuesta inducidas por ACh (0,1 nM - 10  $\mu$ M) en segmentos de aorta de ratas control y orquidectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción con 5-HT, 1  $\mu$ M (controles 1142  $\pm$  129 mg; controles+TCP 1284  $\pm$  155 mg; castrados 1073  $\pm$  278 mg; castrados+TCP 1345  $\pm$  95 mg;  $p > 0,05$ ). El número de animales está indicado entre paréntesis. \* $p < 0,01$  frente a su correspondiente control.

**Tabla 9.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log  $EC_{50}$  a ACh en aorta de ratas control y orquidectomizadas.

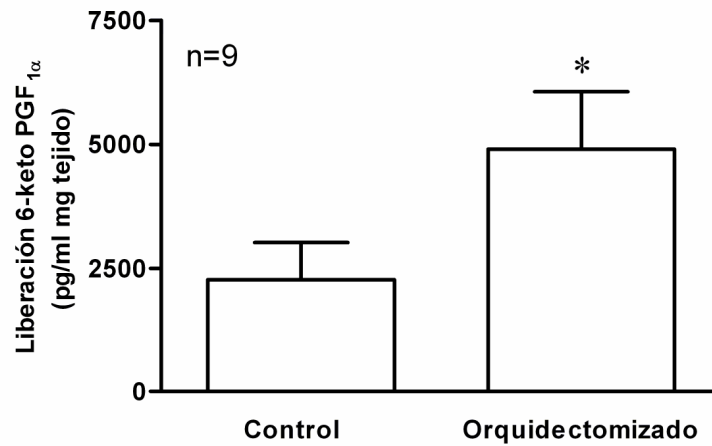
	Control		Orquidectomizado	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b>Control</b>	88,15 $\pm$ 2,5	-7,14 $\pm$ 0,06	93 $\pm$ 2,67 *	-7,3 $\pm$ 0,07 *
<b>TCP</b>	71,02 $\pm$ 3,5 <sup>+</sup>	-7,30 $\pm$ 0,12	67,19 $\pm$ 3,2 <sup>#</sup>	-7,41 $\pm$ 0,12

\*  $p < 0,05$  vs ratas control; <sup>+</sup>  $p < 0,01$  vs condición control en ratas control; <sup>#</sup>  $p < 0,001$  vs condición control en ratas orquidectomizadas.

Este resultado podría indicar un mayor papel vasodilatador de la  $PGI_2$  en arterias de animales castrados, debido a alteraciones en la síntesis de  $PGI_2$  y/o en su efecto vasomotor. Aunque, una vez más, no se puede descartar la modulación en la liberación/función de otros factores.

#### Liberación de $PGI_2$ inducida por ACh

Para analizar el efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre la liberación de la  $PGI_2$  en la respuesta a ACh, se midió la producción de su metabolito estable 6-keto- $PGF_{1\alpha}$  inducida por ACh (0,1 nM - 10  $\mu$ M). Los resultados obtenidos muestran una mayor síntesis de 6-keto- $PGF_{1\alpha}$  estimulada por ACh en animales orquidectomizados (fig.29).

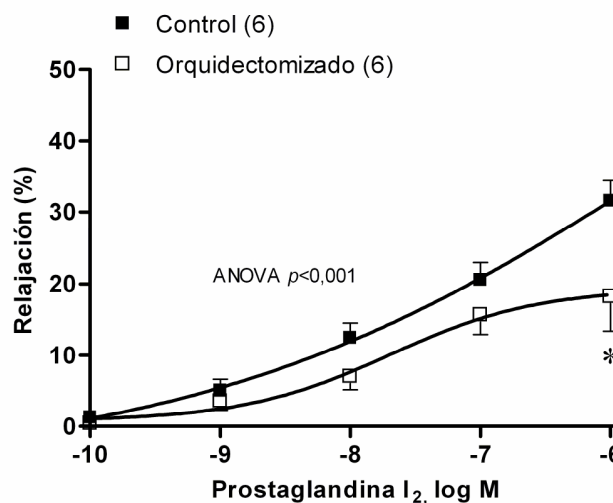


**Figura 29:** Liberación de 6-keto-PGF<sub>1α</sub> inducida por ACh (0,1 nM -10 μM) en aorta de ratas control y orquidectomizadas. Los resultados (media ± EEM) se expresaron como pg 6-keto-PGF<sub>1α</sub>/ml mg tejido. Siendo n el número de animales. \* $p<0,05$  frente a su control.

Estos resultados estarían de acuerdo con lo publicado en el síndrome de humano de agregación plaquetaria en el que la síntesis de PGI<sub>2</sub> se eleva paralelamente al TXA<sub>2</sub> (Fitzgerald, 1991; Caughey y col., 2001). Este incremento en la liberación de PGI<sub>2</sub> observado en aortas de machos orquidectomizados podría ser debido a la superproducción de aniones superóxido observada en estas ratas (Blanco-Rivero y col., 2006b), avalando el concepto de la regulación redox de la síntesis de prostanoides propuesta por Bachschmid y col. (2005).

#### Reactividad vascular a PGI<sub>2</sub>

Con el fin de determinar posibles diferencias en la sensibilidad a PGI<sub>2</sub> debidas a las hormonas sexuales masculinas se realizaron curvas concentración-respuesta a PGI<sub>2</sub> (0,1 nM- 1 μM). El resultado obtenido fue una mayor relajación en machos controles que en orquidectomizados  $p<0,001$  (fig.30, tabla 10).



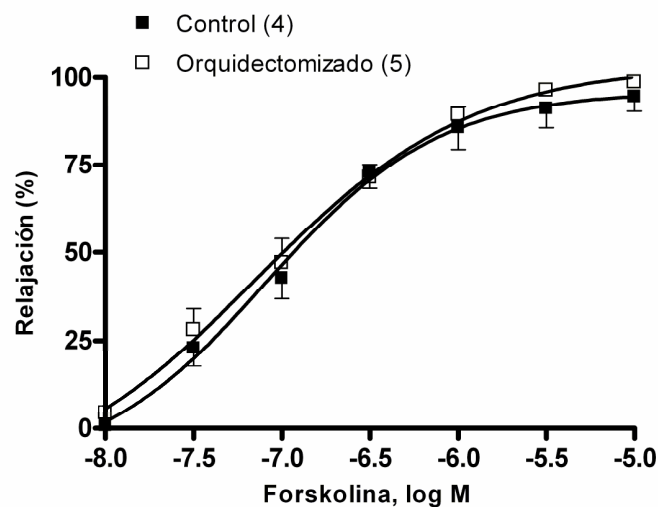
**Figura 30:** Curvas concentración-respuesta al Prostaglandina I<sub>2</sub> en aortas de ratas control y orquidectomizadas. Los resultados (media ± EEM) están expresados en porcentaje de la contracción con 5-HT, 1 mM (control 682 ± 71 mg; castrado 1144 ± 46 mg). El número de animales está indicado entre paréntesis. \* $p<0,01$  frente a su control.

**Tabla 10.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el  $\log EC_{50}$  a  $PGI_2$  en aorta de ratas control y orquidectomizadas.

	Control		Orquidectomizado	
	$E_{max}$ (%)	$\log EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	$\log EC_{50}$
<b><math>PGI_2</math></b>	$39,07 \pm 2,4$	$-7,4 \pm 0,2$	$25,45 \pm 4,5 *$	$-7,2 \pm 0,39$

\*  $p < 0,05$  vs ratas control.

La disminución del efecto vasodilatador de  $PGI_2$  en machos castrados puede ser debido a diferencias en la expresión de receptores IP y/o a diferencias en la cascada de señalización tras la activación del receptor. Se sabe que los receptores IP están acoplados a proteínas Gs que activan la AC incrementando los niveles de AMPc y produciendo relajación del músculo liso, en lo que a esto respecta hemos observado que la relajación inducida por el activador de la AC, forskolina fue similar en arterias de ratas control y orquidectomizadas (fig.31) de lo que se deduce que las diferencias no están en este punto de la cascada de señalización de la  $PGI_2$ .



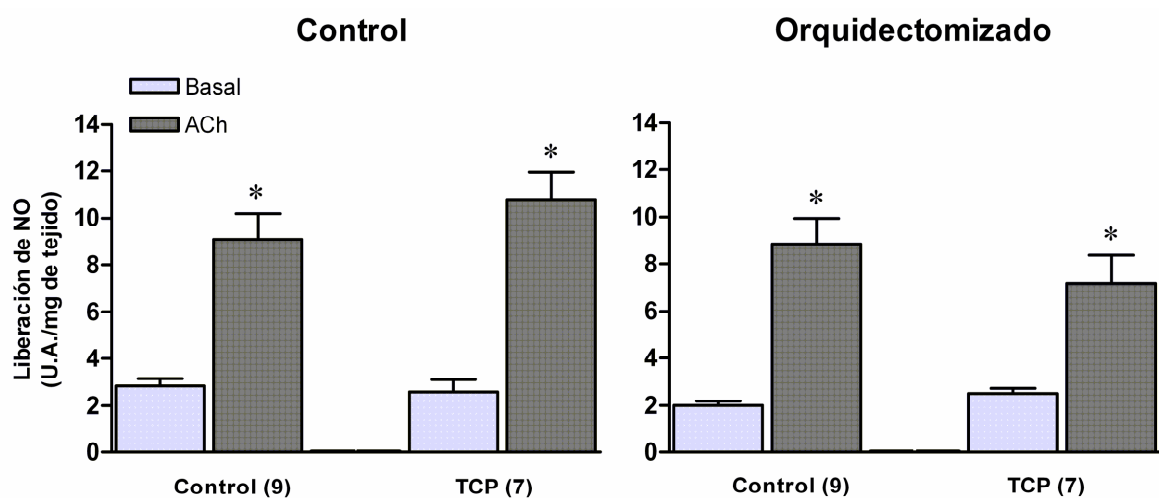
**Figura 31:** Curvas concentración-respuesta a Forskolina (10 nM-10  $\mu$ M) en aortas de ratas control y orquidectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) están expresados en porcentaje de la contracción con 5-HT, 1  $\mu$ M. El número de animales está indicado entre paréntesis.

Este resultado sugiere que en la disminución en la respuesta a  $PGI_2$  en aortas de ratas orquidectomizadas, aunque no se puede descartar que la expresión de los IP estuviera modificada, estaría participando la activación de los receptores TP ya que se ha descrito que un incremento en la producción de  $PGI_2$  puede activar los receptores TP produciendo contracción contrarrestando el efecto vasodilatador (Blanco-Rivero y col., 2005b).

Participación de la PGI<sub>2</sub> en la liberación de NO inducida por ACh.

Puesto que está descrito que la PGI<sub>2</sub> activa la AC incrementando el AMPc y activando la PKA que, entre otros efectos, activa la eNOS (Ray y Marshall, 2006), continuamos con el estudio evaluando el efecto de este prostanoides sobre la liberación de NO inducida por ACh.

La incubación con TCP (10 µM), inhibidor específico de la síntesis PGI<sub>2</sub>, no modificó la liberación de NO ni en animales controles ni en los castrados (fig.32).

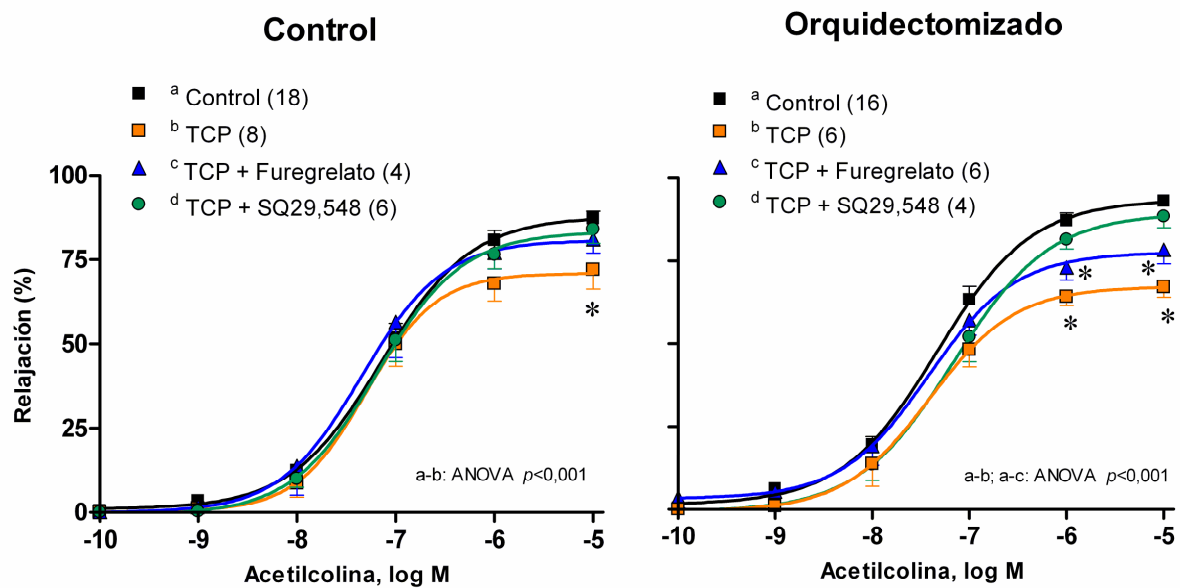


**Figura 32:** Efecto del TCP (10 µM) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y la estimulación con ACh (0,1 nM -10 µM). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. \*  $p < 0,05$  frente a la liberación basal de NO.

Estos resultados sugieren que en la respuesta a ACh en presencia del TCP no existe una participación adicional del NO. Existen evidencias considerables de la relación entre los sistemas del TXA<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> (Cheng y col., 2002): así el TXA<sub>2</sub> derivado de las plaquetas induce la formación de PGI<sub>2</sub> en células endoteliales (Caughey y col., 2001); del mismo modo se ha descrito que los agonistas de los receptores TP inducen la liberación de PGI<sub>2</sub> de las células endoteliales (Marcus y col., 1980). Por otra parte se ha publicado que la inhibición de la TXA<sub>2</sub> sintasa incrementa la síntesis de PGI<sub>2</sub> *in vitro* (Nowak y FitzGerald, 1989). Estos resultados ponen de manifiesto que, la formación y actividad de los dos prostanoïdes pueden interaccionar a través de múltiples mecanismos.

Por tanto, analizamos el efecto funcional de la inhibición simultánea de la síntesis de ambos prostanoïdes. Observamos que la coïncubación de las arterias con TCP y furegrelato revertió la disminución de la respuesta a ACh causada por el TCP en arterias de ratas

controles, mostrando así la existencia de un balance entre  $\text{TXA}_2$  y  $\text{PGI}_2$  en arterias de estos animales (fig.33). Sin embargo, en arterias de ratas orquidectomizadas, la coincubación con TCP y furegrelato no revirtió completamente el detrimento en la respuesta vasodilatadora causada por el TCP, indicando la participación de otros prostanoideos contráctiles distintos a la  $\text{PGI}_2$  y  $\text{TXA}_2$ . Estos prostanoideos activarían también los receptores TP ya que la coincubación del TCP con SQ29,548 revirtió completamente la disminución de la respuesta a ACh producida por el TCP (fig.33). Los valores de  $E_{\max}$  y del  $\log \text{EC}_{50}$  están indicados en la tabla 11.



**Figura 33:** Efecto del TCP (10  $\mu\text{M}$ )+furegrelato (0,1  $\mu\text{M}$ ) y TCP (10  $\mu\text{M}$ )+ SQ29,548 (0,1  $\mu\text{M}$ ) sobre las curvas concentración-respuesta inducidas por ACh (0,1 nM - 10  $\mu\text{M}$ ) en segmentos de aorta de ratas control y orquidectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción con 5-HT, 1  $\mu\text{M}$  (controles  $1142 \pm 129$  mg; controles+TCP+furegrelato  $1483 \pm 289$  mg; controles+TCP+SQ29,458  $1146 \pm 79$  mg; castrados  $1073 \pm 278$  mg; castrados+TCP+furegrelato  $1334 \pm 229$  mg; castrados+TCP+SQ29,458  $1045 \pm 144$  mg,  $p > 0,05$ ). El número de animales está indicado entre paréntesis. \* $p < 0,05$  frente a su correspondiente control.

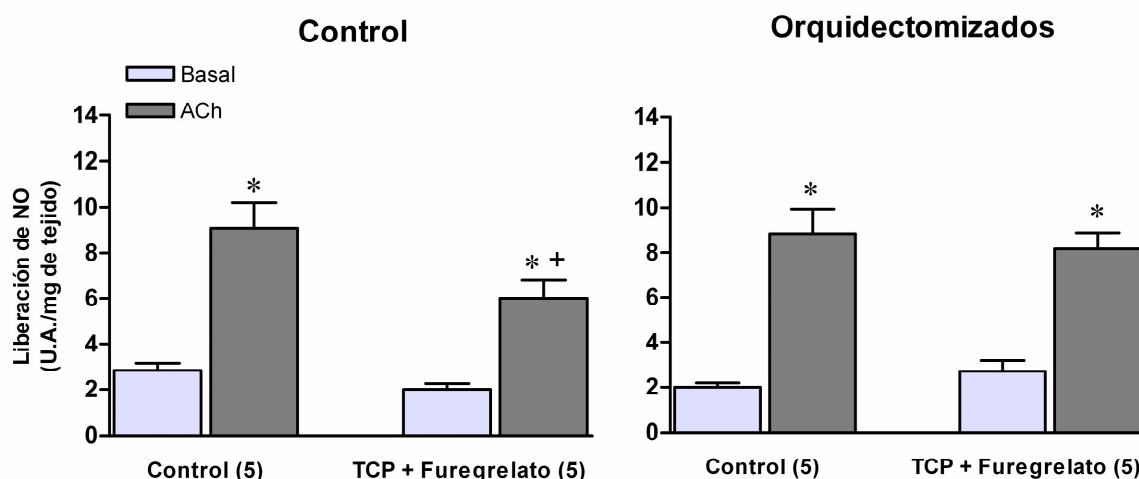
**Tabla 11.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{\max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el  $\log \text{EC}_{50}$  a ACh en aorta de ratas control y orquidectomizadas.

	Control		Orquidectomizado	
	$E_{\max}$ (%)	$\log \text{EC}_{50}$	$E_{\max}$ (%)	$\log \text{EC}_{50}$
<b>Control</b>	$88,15 \pm 2,5$	$-7,14 \pm 0,06$	$93 \pm 2,67$ *	$-7,3 \pm 0,07$ *
<b>TCP + Furegrelato</b>	$80,76 \pm 4,9$	$-7,34 \pm 0,15$	$77,5 \pm 3,6$ #	$-7,42 \pm 0,12$
<b>TCP + SQ29,548</b>	$83,31 \pm 3,4$	$-7,19 \pm 0,09$	$86,13 \pm 3,62$	$-6,69 \pm 0,18$

\*  $p < 0,05$  vs ratas control; #  $p < 0,001$  vs condición control en ratas orquidectomizadas.

En las anteriores condiciones experimentales se analizó el efecto de la inhibición de ambos prostanoides sobre la liberación de NO coincubando con TCP y furegrelato.

La incubación con TCP y furegrelato no produjo diferencias significativas en las liberaciones basales ni en arterias de animales controles ni de orquidectomizados. Sin embargo, observamos una disminución de la liberación de NO estimulada por ACh en animales controles que no se produce en orquidectomizados (fig.34).



**Figura 34:** Efecto del furegrelato (1  $\mu$ M) + TCP (10  $\mu$ M) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y la estimulación con ACh (0,1 nM – 10  $\mu$ M). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia arbitrarias (U.A.) por mg de tejido. \*  $p < 0,05$  frente a la liberación basal de NO; +  $p < 0,05$  frente a su correspondiente control.

Estos resultados indican que la liberación del NO está regulada por otros factores que actúan cuando la síntesis de TXA<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> están inhibidas y que esta regulación también está bajo control hormonal.

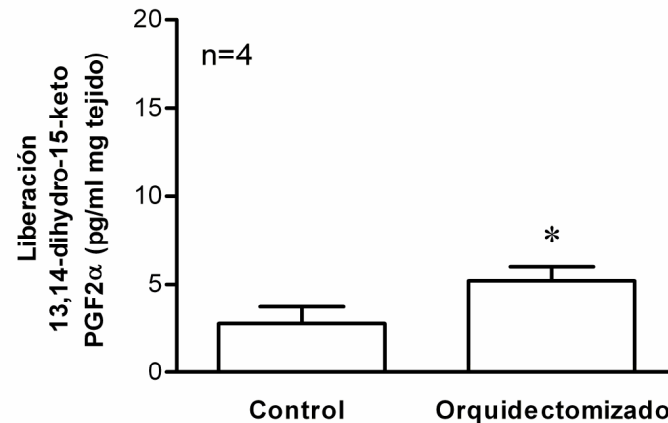
### III.b3. Participación de la PGF<sub>2 $\alpha$</sub> en la respuesta inducida por la ACh.

Puesto que existen otros derivados de COX-2, distintos del TXA<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>, capaces de activar los receptores TP, como puede ser la PGE<sub>2</sub> (Gluais y col., 2007) y la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (Cracowski y col., 2002) y que pueden estar incrementadas cuando la síntesis de TXA<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub> están inhibidas (Bachschmid y col., 2005) se investigó la liberación de ambos inducida por ACh así como su efecto vasomotor.



### Liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ inducida por ACh

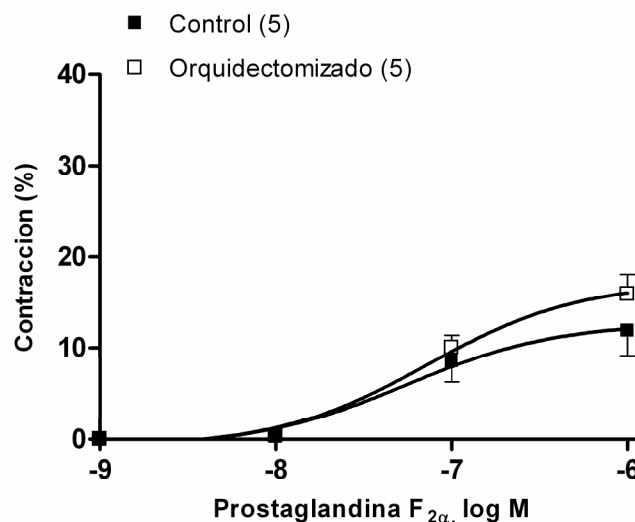
Para analizar el efecto de las hormonas sexuales masculinas sobre la liberación de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en la respuesta a ACh, se midió la producción de su metabolito estable 13,14-dihidro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$  inducida por ACh (0,1 nM – 10  $\mu\text{M}$ ). La liberación de 13,14-dihidro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$  inducida por ACh, aunque muestra valores muy bajos, se incrementó en animales orquitectomizados (fig.35).



**Figura 35:** Producción de 13,14-dihidro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$  inducida por ACh (0,1 nM – 10  $\mu\text{M}$ ) en segmentos de aorta de ratas control y orquitectomizadas. Resultados (media  $\pm$  EEM) están expresados como pg 13,14-dihidro-15-keto  $\text{PGF}_{2\alpha}$ /ml mg tejido. Siendo n el número de animales. \* $p < 0,05$  frente a su control.

### Reactividad vascular a $\text{PGF}_{2\alpha}$

Se realizaron curvas con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (1 nM- 1  $\mu\text{M}$ ) con el fin de determinar las diferencias en la sensibilidad del músculo liso a este prostanoide y se obtuvo una contracción similar en ambos grupos de animales (fig.36, tabla 12).



**Figura 36:** Curvas concentración-respuesta  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (1 nM- 1  $\mu\text{M}$ ) en aortas de ratas control y orquitectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) están expresados en porcentaje de la contracción de KCl 75 mM (control  $1692 \pm 124$  mg; castrado  $1900 \pm 349$  mg). El número de animales está indicado entre paréntesis.

**Tabla 12.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de contracción) y el log  $EC_{50}$  a  $PGF_{2\alpha}$  en aorta de ratas control y orquitectomizadas.

	Control		Orquitectomizado	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b><math>PGF_{2\alpha}</math></b>	$12,82 \pm 2,15$	$-7,25 \pm 0,3$	$17,24 \pm 1,6$	$-7,13 \pm 0,19$

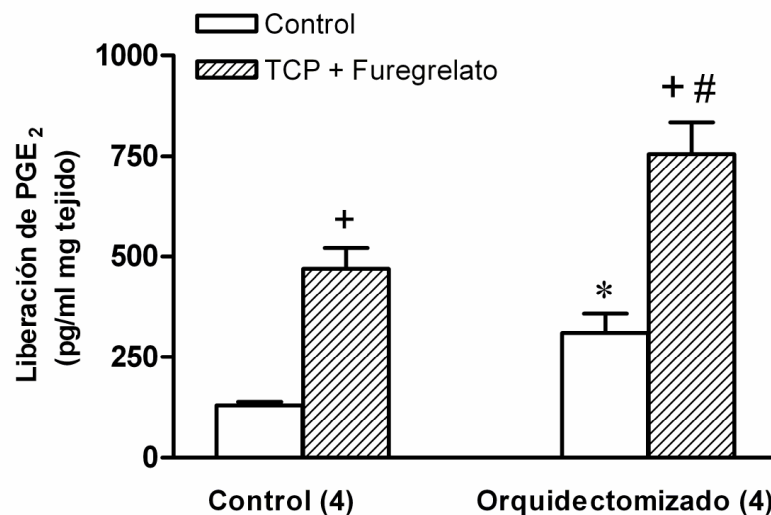
Dada su escasa respuesta vasoconstrictora, el efecto que puede ejercer este prostanoide en la respuesta inducida por ACh no parece ser muy importante.

### III.b4. Participación de la $PGE_2$ en la respuesta inducida por la ACh.

Puesto que la producción de  $PGF_{2\alpha}$  y su efecto vasoconstrictor en animales controles y castrados es tan reducida, se decidió investigar la liberación de  $PGE_2$  y su efecto vasomotor.

#### Liberación de $PGE_2$ inducida por ACh

La liberación de  $PGE_2$  inducida por ACh fue mayor en machos orquitectomizados (fig.37).



**Figura 37:** Producción de  $PGE_2$  inducida por ACh (0,1 nM – 10  $\mu$ M) en segmentos de aorta de ratas control y orquitectomizadas; efecto del TCP (1 $\mu$ M) + furegrelato (1 $\mu$ M) en la producción de  $PGE_2$  inducida por ACh (0,1 nM -10  $\mu$ M). Resultados (media  $\pm$  EEM) están expresados como pg  $PGE_2$ /ml mg tejido. El número de animales está indicado entre paréntesis. \* $p < 0,05$  frente al control correspondiente; + $p < 0,05$  comparando las arterias en ausencia de TCP y furegrelato; # $p < 0,05$  comparando con arterias de machos orquitectomizados en presencia de TCP + furegrelato.

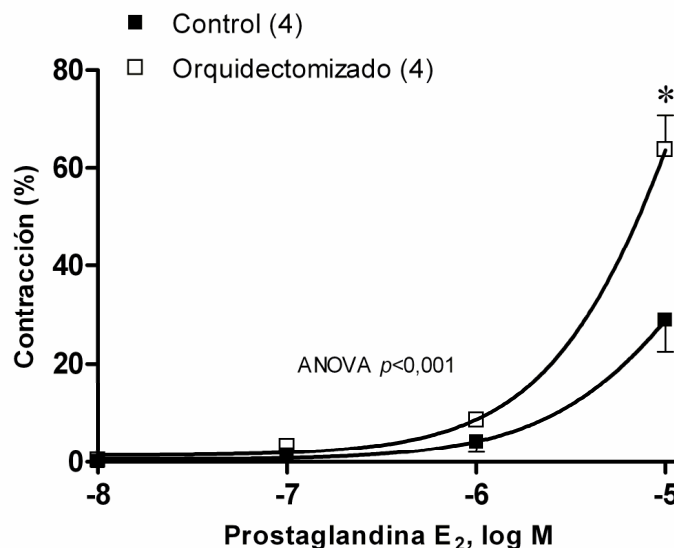
Existen publicaciones que atribuyen a las hormonas sexuales masculinas cierto papel en la regulación de la liberación de  $PGE_2$ , en cuanto a que el tratamiento con testosterona reduce

notablemente la producción de este prostanoide en células endoteliales de aorta (Myers y col., 1996) o que la orquidectomía incrementa la liberación de  $\text{PGE}_2$  y la expresión de la  $\text{PGE}_2$  sintasa microsomal en ratas hipertensas (Sullivan y col., 2005).

Se analizó el efecto de los inhibidores de la síntesis de  $\text{TXA}_2$  y  $\text{PGI}_2$  en la liberación de  $\text{PGE}_2$  inducida por ACh. Se observó que, en estas condiciones experimentales, la ACh indujo un producción de  $\text{PGE}_2$  mucho mayor, posiblemente como consecuencia de un incremento de la producción de  $\text{PGH}_2$  y consecuente transformación en  $\text{PGE}_2$  (Blanco-Rivero y col., 2007b; Frein y col., 2005). Pero lo que es más importante, la  $\text{PGE}_2$  incrementó de forma más pronunciada en arterias de ratas orquidectomizadas que en sus correspondientes controles (fig.37). Este resultado confirma nuestra hipótesis de que cuando se inhibe la síntesis de  $\text{PGI}_2$  y  $\text{TXA}_2$ , la síntesis de  $\text{PGE}_2$  se ve incrementada y además que esta regulación se halla bajo control hormonal.

#### Reactividad vascular a $\text{PGE}_2$

Con el fin de determinar posibles diferencias en la sensibilidad a  $\text{PGE}_2$  se realizaron curvas concentración-respuesta a  $\text{PGE}_2$  (1 nM- 10  $\mu\text{M}$ ). Este prostanoide indujo una contracción dependiente de concentración que se vio incrementada en machos orquidectomizados (fig.38, tabla 13).



**Figura 38:** Curvas concentración-respuesta  $\text{PGE}_2$  en aortas de ratas control y orquidectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) están expresados en porcentaje de la contracción de KCl 75 mM (controles  $1278 \pm 117$  mg; castrados  $1375 \pm 157$  mg). El número de animales está indicado entre paréntesis. \* $p < 0,001$  frente a su correspondiente control.

**Tabla 13.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de contracción) y el log  $EC_{50}$  a  $PGE_2$  en aorta de ratas control y orquidectomizadas.

	Control		Orquidectomizado	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b><math>PGE_2</math></b>	$30,12 \pm 1,3$	$-5,58 \pm 0,2$	$62,01 \pm 1,7^{**}$	$-5,57 \pm 0,19$

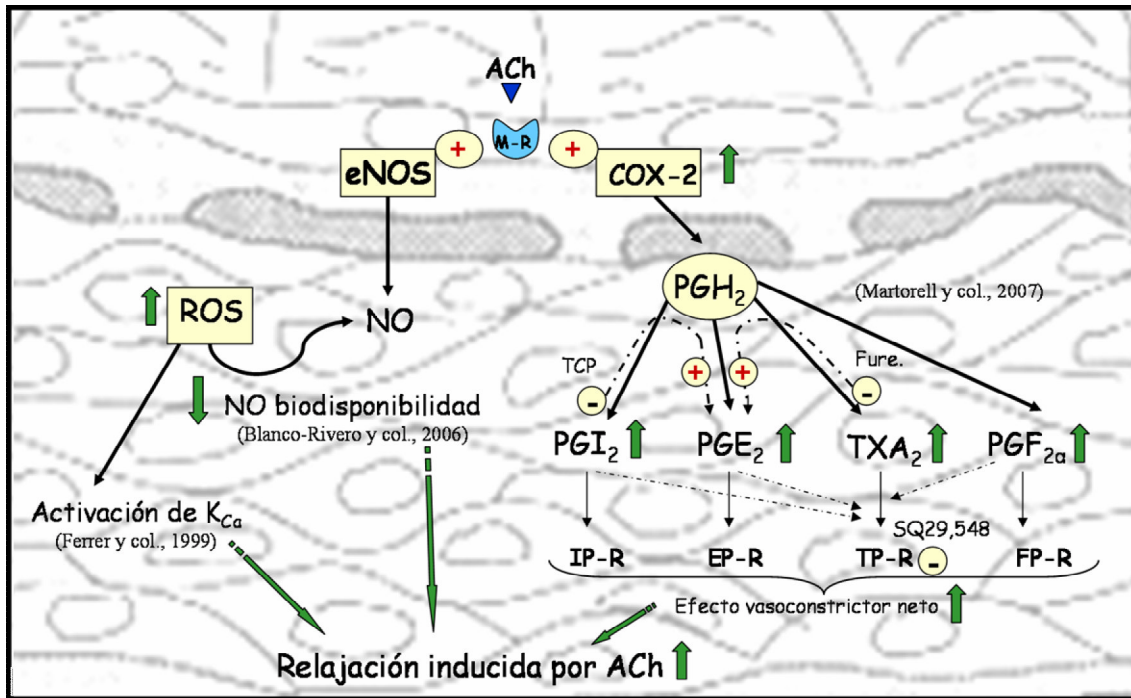
**\*\***  $p < 0,001$  vs ratas control.

Esta mayor sensibilidad de las células musculares lisas de ratas orquidectomizadas a la  $PGE_2$ , puede ser debido a alteraciones en la vía de señalización y/o a diferencias en la expresión de los distintos subtipos de receptores que median vasodilatación y vasoconstricción. En este sentido, es importante señalar que en presencia de furegrelato y TCP, condiciones en la que la síntesis de  $PGE_2$  está elevada y la liberación de NO disminuida, no se modifica la respuesta a ACh en animales controles.

Esto podría explicarse porque la liberación de  $PGE_2$  no fuera suficiente para producir un efecto vasomotor y/o porque la expresión de los receptores EP que median vasodilatación estuviera incrementada en arterias de animales controles y contrarrestara el efecto vasoconstrictor de la  $PGE_2$ .

En resumen, este estudio demuestra que la orquidectomía incrementa la expresión de COX-2, e induce un desequilibrio en la producción y efecto vasomotor de prostanoïdes vasoconstrictores y vasodilatadores (Martorell y col., 2007), siendo los prostanoïdes vasoconstrictores los predominantes. Esta situación *per se*, puede indicar una desventaja en la función cardiovascular en ausencia de hormonas sexuales masculinas. Anteriormente, se ha descrito una menor biodisponibilidad del NO en aortas de ratas orquidectomizadas (Blanco-Rivero y col., 2006b) que podría contrarrestar la respuesta vasodilatadora a ACh. Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, la respuesta vasodilatadora a ACh está incrementada en aortas de ratas orquidectomizadas, probablemente como consecuencia de mecanismos compensatorios, como la activación de canales de  $K_{Ca}$  por los aniones superóxido cuya formación está incrementada en machos castrados (Ferrer y col., 1999) (fig.39).

Este estudio también pone de manifiesto la participación simultánea de múltiples vías de señalización que confieren al sistema experimental utilizado una enorme complejidad.



**Figura 39:** Esquema que muestra el efecto de la orquidectomía sobre la relajación inducida por la ACh. El esquema muestra que la orquidectomía incrementa la expresión de COX-2 y que cuando la ACh activa los receptores muscarínicos (M-R) se induce la liberación de PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>; la orquidectomía incrementa la liberación de PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub>. Adicionalmente, cuando se inhibe la síntesis de PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> por TCP y furegrelato, respectivamente, la liberación de PGE<sub>2</sub> se incrementa, y la orquidectomía incrementa este efecto. Estos prostanoideos a través de sus respectivos receptores específicos ejercen un efecto vasoconstrictor neto en ratas orquidectomizadas. A pesar de estas modificaciones, la respuesta inducida por ACh permanece incrementada en aortas de ratas orquidectomizadas. Este resultado probablemente es una consecuencia de mecanismos compensatorios como el efecto dual de los O<sub>2</sub><sup>-</sup>; cuya formación está incrementada en ratas orquidectomizadas, reduciendo la biodisponibilidad del NO y activando los K<sub>Ca</sub>.

## EFFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES FEMENINAS SOBRE:

### I. Niveles de hormonas en sangre, peso corporal y presión arterial.

La concentración de  $17\beta$ -estradiol en plasma de hembras ovariectomizadas se ve reducida en un 30% con respecto a las hembras en estro ( $p<0,05$ ), resultado que avalan muchas otras publicaciones (Teede y col., 2001). En determinados experimentos de larga duración con ovariectomizadas se detectaron niveles significativos de estrógenos en sangre, sugiriendo que algunos órganos como las glándulas adrenales pueden contribuir a la secreción de estradiol (Watanobe y Yoneda, 2003).

La ovariectomía aumentó en un 28% el peso de las ratas con respecto a sus controles en estro ( $p<0,001$ ) indicando que la pérdida de estrógenos produce alteraciones en el balance de energía y en el metabolismo lipídico, como se ha descrito anteriormente (Teede y col., 2001; Lemieux y col., 2003; Choi y col., 2005; Ferrer y col., 1996).

La ovariectomía no modificó las presiones sanguíneas de acuerdo con lo publicado anteriormente (Conrad y col., 1994; Ferrer y Osol, 1998) (tabla 14).

	Estro	Ovariectomizada
Niveles de estrógenos en plasma (pg/ml)	$385,9 \pm 34^a$ (9)	$297,4 \pm 35^b$ (8)
Peso del animal (g)	$292,7 \pm 10,4^c$ (31)	$375,7 \pm 4,9^d$ (22)
Presiones sanguíneas	$121,5 \pm 3,5$ (6)	$132,5 \pm 9,5$ (6)

**Tabla 15.** Efecto de la orquidectomía sobre: los niveles de testosterona en plasma, el peso del animal y las presiones sanguíneas. Los valores (media  $\pm$  EEM) el número de animales viene indicado entre paréntesis. a-b  $p<0,01$ , c-d  $p<0,001$

Por tanto los resultados obtenidos en nuestro estudio no van acompañados de cambios hemodinámicos y son producidos por la pérdida parcial de estógenos.

### II. Respuesta contráctil inducida por KCl y 5-HT.

La respuesta contráctil inducida por 75 mM de KCl fue similar en ambos grupos de animales (controles  $1346 \pm 60$  mg, n=42; ovariectomizadas  $1425 \pm 75$  mg, n=33  $p>0,05$ ) tal

y como ya había sido publicado en estudios previos en arteria mesentérica (Minoves y col., 2002) y aorta (Tejera y col., 1999). Sin embargo, también existe controversia en este punto, ya que se ha descrito un incremento en la contracción a KCl tanto en ratas ovariectomizadas (Paul y col., 2007) como en ratas tratadas con estradiol (Aikawa y col., 2003). Sin embargo, se han publicado estudios en los que el tratamiento con estrógenos incrementa el número y densidad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rendt y col., 1992) o produce un efecto hipertrófico muscular aumentando la función contráctil (Aikawa y col., 2003), por lo que los modelos y condiciones experimentales parecen jugar un papel decisivo.

La respuesta contráctil inducida por 1  $\mu\text{M}$  de 5-HT fue similar (controles  $807,5 \pm 69$  mg; ovariectomizadas  $935 \pm 56$  mg,  $n=33$   $p>0,05$ ) en ambos grupos de animales. Estos resultados difieren de otras publicaciones en las que atribuyen a los estrógenos la capacidad de incrementar la respuesta a serotonina en arteria carótida de rata (Mehrotra y col., 2007).

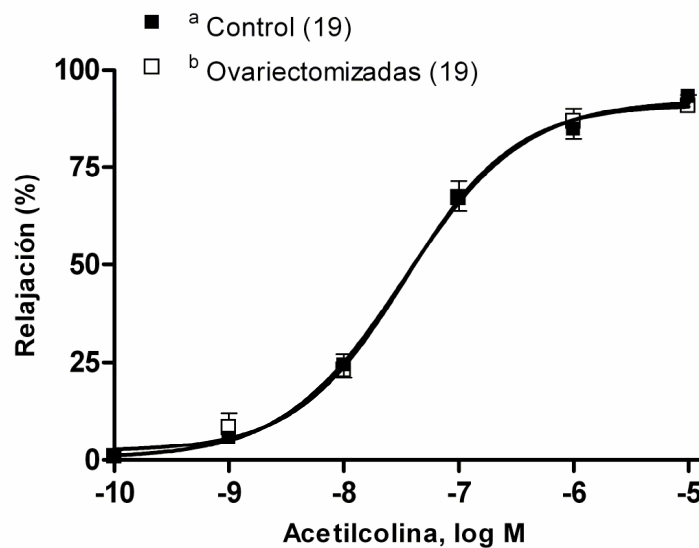
Se han descrito diferencias de género en las respuestas contráctiles a diferentes agonistas, aunque existe controversia sobre la naturaleza de estas diferencias, con variaciones dependiendo del lecho, agonista y especie estudiada. En nuestro estudio la contracción inducida por KCl fue menor en hembras que en machos. Se sabe que la despolarización de la membrana por KCl estimula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  aunque la razón de las diferencias que se encuentran en esta contracción debidas al género no están claras, pero puede deberse a diferencias en la densidad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática, o a su permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  dependiendo de la presencia o ausencia de estrógenos. Esto se ha podido comprobar en cardiomiocitos de ratones deficientes en receptores de estrógenos, en las que aumenta la expresión de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Además, la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L es mayor en machos que en hembras (Johnson y col., 1997; Bowles, 2001). Adicionalmente, se ha descrito que tanto los estrógenos (Zhang y col., 2006) como los andrógenos (Foradori y col., 2007) pueden modificar la sensibilidad de los filamentos de actina por el  $\text{Ca}^{2+}$ .

El endotelio juega un papel importante en la regulación del tono arterial mediante la liberación de factores vasodilatadores y contráctiles dependientes del endotelio. El detrimento de la biodisponibilidad de NO derivado del endotelio, es reconocido como un importante promotor de las enfermedades cardiovasculares. El efecto estimulador de esteroides femeninos en general y de los estrógenos en particular sobre la producción de NO ha sido el objeto de múltiples estudios (Hishikawa y col., 1995; Wiener y col., 1994).

Teniendo en cuenta que la ACh es capaz de inducir la formación de NO y prostanoïdes (Mitchell y col., 1992; Schulz y col., 1992), se estudió de forma similar al indicado en ratas macho el efecto vasodilatador de la ACh así como la participación del NO y prostanoïdes en dicha respuesta en presencia y ausencia de hormonas femeninas.

### III. Respuesta vasodilatadora inducida por ACh

La respuesta vasodilatadora a ACh exógena fue similar en hembras controles y en ovariectomizadas (fig.40) hecho que avalan otras publicaciones (Zhou y col., 2005, Tejera y col., 1999).



**Figura 40:** Vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM -10  $\mu$ M) en segmentos de aorta de hembras controles y ovariectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción con 5-HT 1  $\mu$ M (controles  $807,5 \pm 69$  mg; ovariectomizadas  $935 \pm 56$  mg). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis.

Esto difiere de lo publicado por otros grupos de investigación dónde la ovariectomía reducía la relajación a ACh en aorta de rata (Figar y col., 2006, Castillo y col., 2005; Cheng y col., 1994) o en femoral de conejo (Gisclard y col., 1988). Estas diferencias pueden ser debidas a la edad, cepa del animal o al tratamiento con estrógenos. Esta heterogeneidad en los efectos de los estrógenos en la modulación de la relajación dependiente de endotelio a ACh puede reflejar cambios en la liberación y/o función de los distintos factores endoteliales, dependiendo del lecho estudiado y condiciones experimentales.

Si comparamos en ambos sexos la relajación inducida por ACh observamos un incremento de la misma en hembras con respecto a los machos controles, argumento que ha sido usado

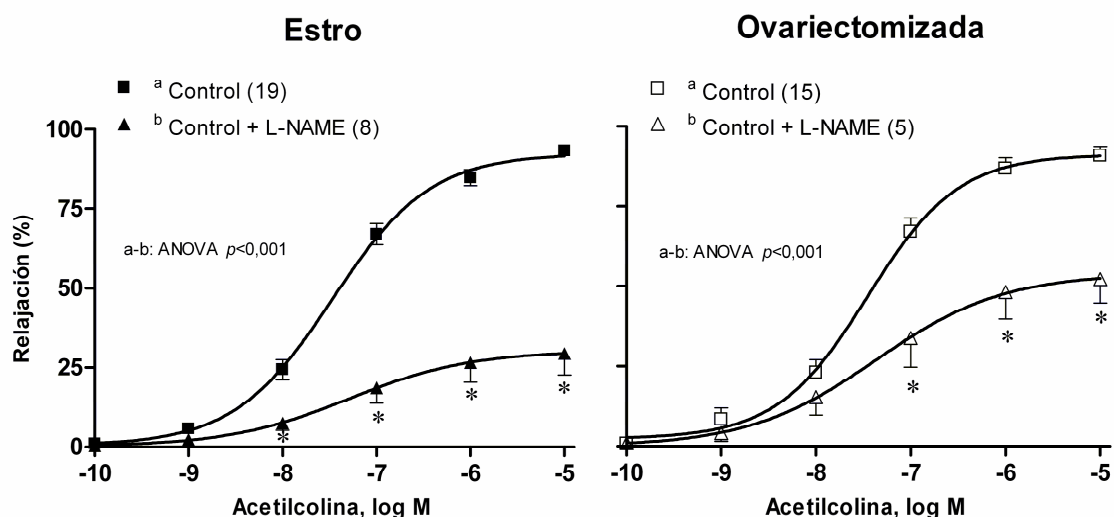


en numerosas publicaciones a favor del papel cardioprotector de las hormonas sexuales femeninas (Kauser y Rubanyi, 1994; Momoi y col., 2003, Fletcher y Colditz, 2002), sin tener en cuenta el potencial efecto cardioprotector de los andrógenos en machos, como posteriormente se ha demostrado (Jones y col., 2004; Martorell y col., 2007).

Como se ha descrito anteriormente para las hormonas sexuales masculinas, no se puede descartar que las hormonas sexuales femeninas modulen la participación del NO y de los distintos prostanoides en dicha respuesta aunque la ovariectomía no modifique la respuesta a ACh, por lo que será analizado a continuación.

### III.a. Participación del NO endotelial

Con el fin de analizar la implicación del NO endotelial en la respuesta a ACh segmentos de ambos grupos de animales se incubaron con L-NAME. La preincubación con L-NAME (0,1 mM), redujo la respuesta a ACh en hembras controles de lo que se deduce que la respuesta vasorelajadora a ACh es debida principalmente al NO. Por el contrario, la incubación con L-NAME en segmentos de hembras ovariectomizadas redujo en menor medida la respuesta a ACh (fig.41). Los valores de  $E_{max}$  y  $EC_{50}$  están incluidos en la tabla 16.



**Figura 41:** Efecto de L-NAME (0,1 mM) sobre la vasodilatación inducida por ACh (0,1 nM -10  $\mu$ M) en segmentos de aorta de hembras controles y ovariectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción con 5-HT 1  $\mu$ M (controles  $807,5 \pm 69$  mg; controles + L-NAME  $1147 \pm 95$  mg; ovariectomizadas  $935 \pm 56$  mg; ovariectomizadas + L-NAME  $906 \pm 54$  mg). El número de animales en cada grupo está indicado entre paréntesis. \* $p < 0,001$  comparando con la situación control.

**Tabla 16.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log  $EC_{50}$  a ACh en aorta de ratas control y ovariectomizadas.

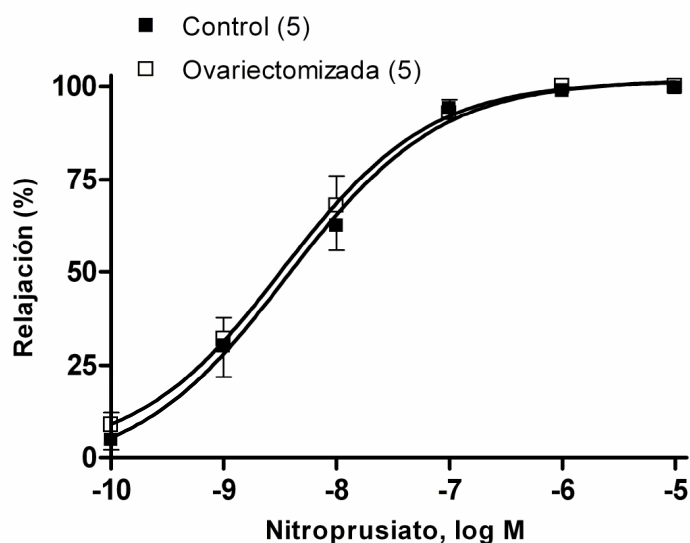
	Control		Ovariectomizada	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b>Control</b>	$92,19 \pm 2,3$	$-7,47 \pm 0,06$	$93,53 \pm 2,5$	$-7,48 \pm 0,07$
<b>L-NAME</b>	$30,32 \pm 5,8$ <sup>+</sup>	$-7,29 \pm 0,50$	$53,93 \pm 7,5$ <sup>* #</sup>	$-7,26 \pm 0,33$

\*  $p < 0,05$  vs ratas control; <sup>+</sup>  $p < 0,01$  vs condición control en ratas control; <sup>#</sup>  $p < 0,001$  vs condición control en ratas ovariectomizadas.

Estas diferencias podrían ser debidas a la disminución en la formación de NO en hembras ovariectomizadas, la disminución del efecto vasomotor del NO y/o al incremento de sustancias vasoconstrictoras que contrarresten el efecto dilatador del NO.

#### Reactividad vascular al Nitroprusiato sódico (SNP)

La vasodilatación inducida por SNP no se vio modificada por la ovariectomía, indicando que los estrógenos no alteran la sensibilidad del músculo liso vascular al donante de NO como también había sido publicado en aorta de rata (Yamaguchi y col., 2001) (fig.42).



**Figura 42:** Efecto vasodilatador de SNP (0,1 nM -10  $\mu$ M) en aorta de ratas hembras control y ovariectomizadas. Los resultados (medias  $\pm$  EEM) se expresaron como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por 1  $\mu$ M de 5-HT (control,  $1107 \pm 88$  mg; ovariectomizadas,  $1040 \pm 72$  mg). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis.

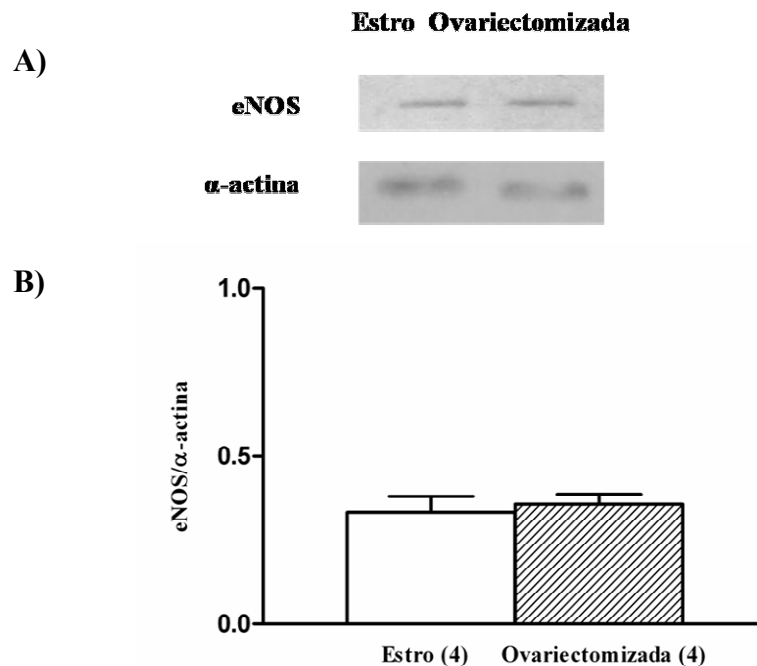
**Tabla 17.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log  $EC_{50}$  a SNP en aorta de ratas control y ovariectomizadas.

	Control		Ovariectomizada	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b>SNP</b>	101,8 ± 4	-8,43 ± 0,19	101,5 ± 3,7	-8,47 ± 0,19

Al igual que en machos, la respuesta al donante de NO no sufre diferencias por la gonadectomía, si bien es verdad, la vasodilatación inducida por el SNP es más pronunciada en hembras que en machos como ya había sido publicado (Kahonen y col., 1998), indicando una modulación dependiente del sexo.

#### Expresión de eNOS

Teniendo en cuenta que la participación del NO endotelial inducida por ACh parece mayor en hembras en estro y sin embargo la sensibilidad del músculo liso al NO no varía, se analizó si la expresión de eNOS se veía modificada por la ovariectomía, observándose que no existían diferencias entre ambos grupos (fig.43).

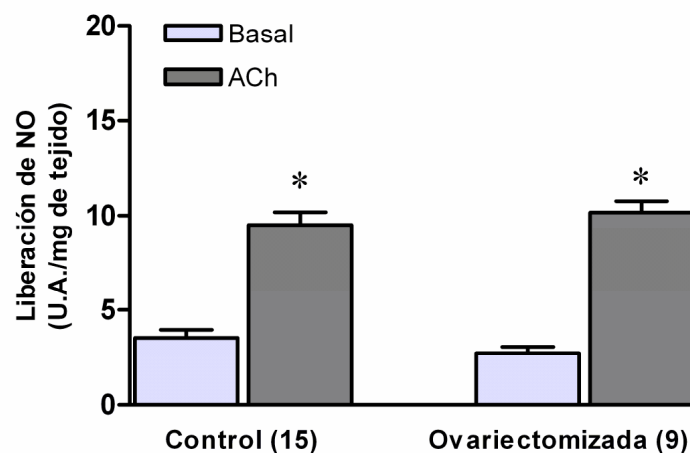


**Figura 43:** Western blot representativo para la expresión de eNOS en segmentos de aorta de ratas hembras en estro y ovariectomizadas (A). La figura es representativa de cuatro segmentos separados de cada grupo de animales. El panel B muestra el análisis densitométrico de la expresión de eNOS. Los resultados (medias ± EEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para eNOS y la obtenida para la α-actina.

Con respecto a la regulación de la expresión de la eNOS por estrógenos, los resultados son contradictorios. Se ha descrito que los estrógenos no modifican (Nawate y col., 2005) e incrementan (Hishikawa y col., 1995; Gonzales y col., 2001) la expresión de la eNOS a través de distintos mecanismos que incluyen el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula endotelial (Weiner y col., 1994) y a la presencia de elementos de respuesta a estrógenos en el promotor de la eNOS modulando su expresión (Marsden y col., 1993). Por lo tanto, la regulación de la expresión de eNOS por los estrógenos es controvertida y difiere dependiendo del lecho estudiado, cepa del animal y posible tratamiento con estrógenos.

#### Liberación de NO inducida por ACh.

El siguiente paso, por tanto, consistió en analizar la liberación de NO basal e inducida tras la estimulación con ACh en aortas de hembras control y ovariectomizadas. La ovariectomía no produjo cambios en la liberación basal ni en la estimulada por ACh (fig.44).



**Figura 44:** Efecto de ovariectomía sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y estimulada por ACh. El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. \*  $p < 0,05$  frente a la liberación basal de NO.

Estos resultados concuerdan con otras publicaciones en las que muestran que el tratamiento de ratas ovariectomizadas con hormonas sexuales femeninas no incrementa la liberación de NO en aorta de rata (Vedernikov y col., 1997).

Puesto que la expresión de la eNOS no varió por la ovariectomía y no se modificó la liberación de NO, se podría hipotetizar que la actividad de la enzima no se ve alterada por

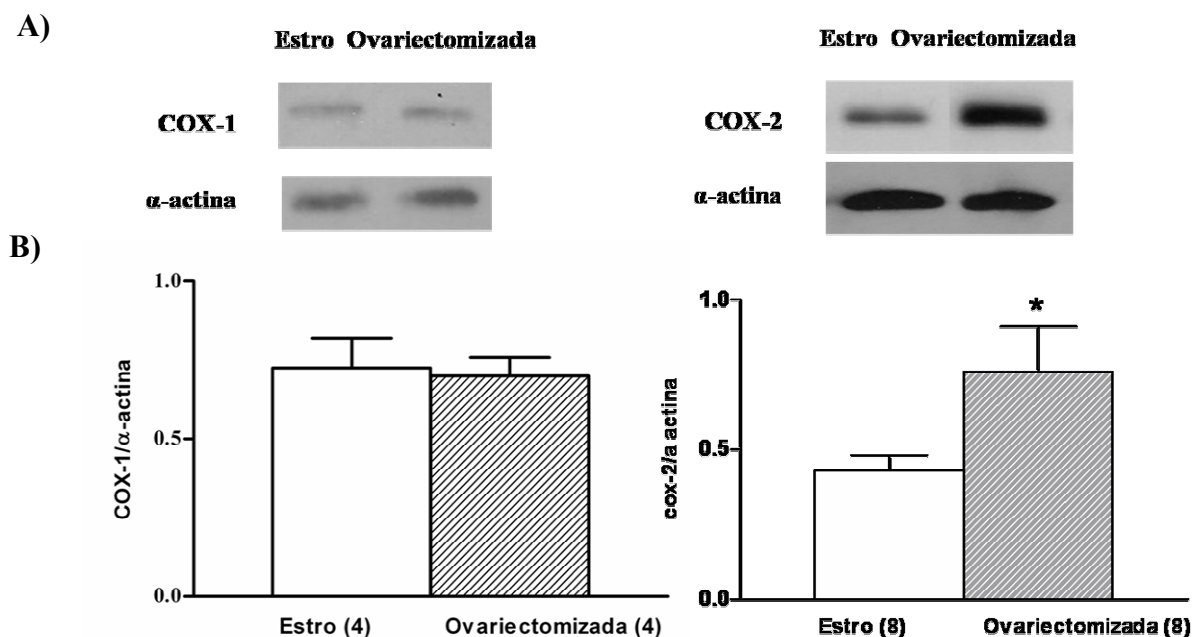
el déficit de hormonas como ha sido descrito (Barber y Miller, 1997; Riveiro y col., 2001). Sin embargo, existen publicaciones que muestran que los estrógenos incrementan la actividad de la eNOS (Weiner y col., 1994; Wellmann y col., 1996; Meyer y col., 1997) regulando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hishikawa y col., 1995; Hayashi y col., 1992). Esta variabilidad de los efectos del estradiol en las respuestas vasculares puede ser debido a las distintas especies estudiadas, la concentración y duración del tratamiento con estrógenos, y/o del lecho vascular estudiado. No se obtuvieron diferencias entre la liberación de NO de hembras en estro y machos, sin embargo hay estudios que afirman que las hormonas sexuales femeninas incrementan la liberación de NO en hembras comparados con los machos (Teede y col., 2001; Hayashi y col., 1992; Kauser y Rubanyi, 1994).

### III.b. Participación de prostanoides

Teniendo en cuenta que los estrógenos pueden modular la expresión de COX y por tanto la liberación de distintos prostanoides, de forma similar a lo descrito para las hormonas sexuales masculinas, se analizó si las hormonas sexuales femeninas regulan la participación de prostanoides en la respuesta inducida por ACh.

#### Expresión de la COX-1 y COX-2

La ovariectomía no modificó la expresión de COX-1, sin embargo, aumentó la expresión de COX-2 (fig .45).

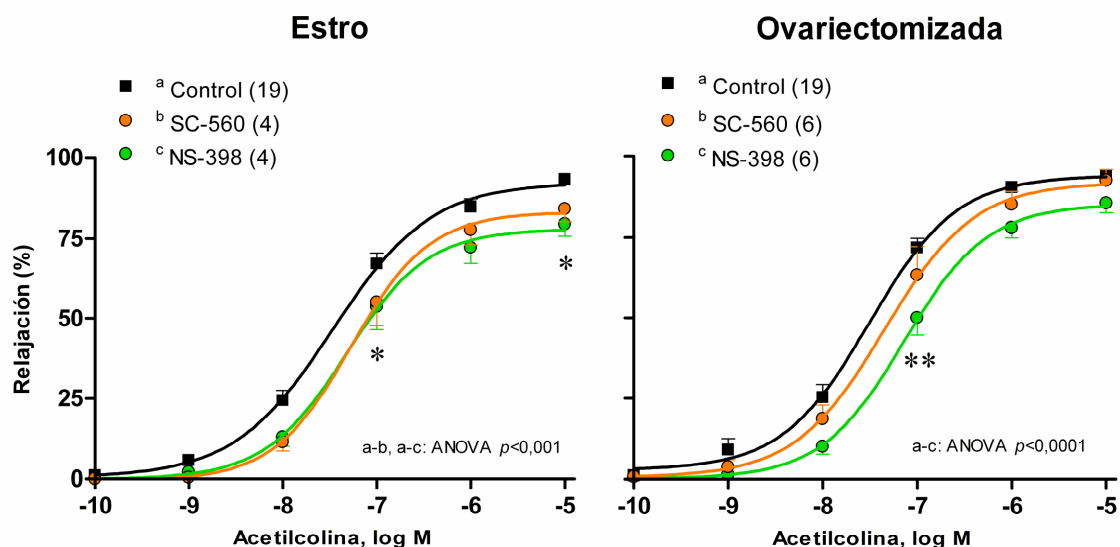


**Figura 45:** Western blot representativo para la expresión de COX-1 y COX-2 en segmentos de aorta hembras en estro y ovariectomizadas (A). La figura es representativa de cuatro y ocho segmentos separados de cada grupo de animales. El panel B muestra el análisis densitométrico de la expresión de COX-1/2. Los resultados (medias  $\pm$  EEM) se expresaron como el ratio entre la señal obtenida para COX-1/2 y la obtenida para la  $\alpha$ -actina. \* $p < 0,05$ .

Teniendo en cuenta que las ROS activan la COX-2 (Feng y col., 1995; Kulmacz y Wang, 1995), y sabiendo que los aniones superóxido están incrementados por la ovariectomía (Sagredo y col., 2007), se podría de este modo explicar el incremento de la expresión de COX-2 en ratas castradas. Sin embargo, estos resultados difieren de otros estudios dónde se sugiere que los estrógenos incrementan la expresión de COX-1 (Korita y col., 2004) y COX-2 (Pedram y col., 2002). Por ejemplo, en cultivos de células endoteliales humanas, los estrógenos inducen la expresión de COX-2 (Pedram y col., 2002). Del mismo modo los estrógenos incrementan la producción de prostanoïdes en células endoteliales de vena umbilical humana mediante el incremento de la expresión de COX-2 pero no de COX-1 (Akarasereenont y col., 2000). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los cultivos celulares están sometidos a periodos de exposición a estrógenos bastante más cortos que las ratas de nuestro modelo experimental. Además, teniendo en cuenta que las células endoteliales aisladas no están sometidas a los mismos estímulos que las células que se encuentran formando parte de la pared arterial, los resultados no son comparables en su totalidad. Debido a las diferencias observadas hasta el momento, se estudió la participación de los distintos derivados de COX en la respuesta a ACh.

#### Participación de COX-1 y COX-2 en la respuesta inducida por ACh

La preincubación con el SC-560 y con NS-398, produjo una reducción en la respuesta a ACh en segmentos de hembras en estro. Sin embargo, en arterias de ovariectomizadas la incubación con SC-560 no produjo cambios en la relajación a ACh, pero fue disminuida por el NS-398 (fig.46, tabla 18).



**Figura 46:** Efecto del SC-560 (0,1  $\mu$ M) y el NS-398 (10  $\mu$ M) sobre las curvas concentración-respuesta a ACh en segmentos precontraídos con 5-HT de hembras control y ovariectomizadas. Los resultados (medias  $\pm$  EEM) se expresaron como inhibición de la contracción producida por 1  $\mu$ M de 5-HT (control,  $807 \pm 69$ ; control + SC-560,  $685 \pm 70$ ; control + NS-398,  $667 \pm 69$ ; ovariectomizadas,  $935 \pm 56$  mg; ovariectomizadas + SC-560,  $767 \pm 115$ ; ovariectomizadas + NS-398,  $904 \pm 118$ ). El número de animales se indicó entre paréntesis. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  comparando con la situación control.

**Tabla 19.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log  $EC_{50}$  a ACh en aorta de ratas control y ovariectomizadas.

	Control		Ovariectomizada	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b>Control</b>	92,19 ± 2,3	-7,47 ± 0,06	93,53 ± 2,5	-7,48 ± 0,07
<b>SC-560</b>	83,17 ± 3,6 <sup>+</sup>	-7,27 ± 0,1	92,02 ± 4,2 <sup>*</sup>	-7,35 ± 0,11
<b>NS-398</b>	78,05 ± 3,5 <sup>+</sup>	-7,32 ± 0,11	85,20 ± 0,2 <sup>#</sup>	-7,14 ± 0,07 <sup>#</sup>

\*  $p < 0,05$  vs ratas control; <sup>+</sup>  $p < 0,05$  vs condición control en ratas control; <sup>#</sup>  $p < 0,001$  vs condición control en ratas ovariectomizadas.

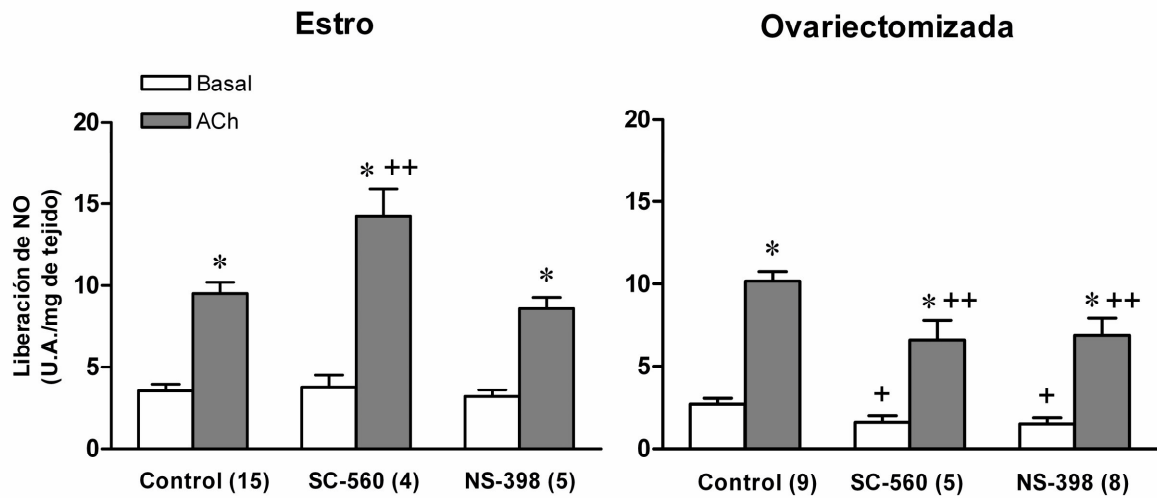
La disminución de la relajación en hembras controles en presencia de ambos inhibidores sugiere que los derivados de ambas isoformas participan en la respuesta vasodilatadora, y que al inhibir una de las isoformas se incrementa la actividad de la otra, y/o que se modifique la liberación y/o señalización del NO.

La disminución de la relajación a ACh en presencia de NS-398 en hembras ovariectomizadas nos sugiere que derivados de COX-2 vasodilatadores, puedan estar implicados en la relajación a ACh en hembras ovariectomizadas. En este sentido Vizioli y col. (2005) investigaron la implicación de los prostanoïdes en la respuesta a ACh y determinaron que juegan un papel importante, aproximadamente de un 20%, en la relajación vascular a ACh. Sin embargo, puesto que se ha publicado que inhibidores de COX-2 amplifican la señalización NO/GMPc, nos permite especular que las hormonas sexuales femeninas podrían regular la contribución de diferentes prostanoïdes en la respuesta mediada por ACh. También existe la posibilidad de que la inhibición de la COX produzca alteraciones en la síntesis de NO, como se ha descrito anteriormente (Mollace y col., 2005).

#### Participación de productos derivados de COX en la liberación de NO inducida por ACh

Por lo tanto, el siguiente paso consistió en estudiar el efecto de las dos isoformas de la COX, sobre la liberación de NO inducida por ACh. El inhibidor de COX-1, SC-560 incrementó la liberación de NO en hembras en estro mientras que NS-398 no produjo diferencias. En hembras ovariectomizadas los inhibidores de ambas isoformas de COX

produjeron una disminución en la liberación de NO tanto basal como estimulada por ACh



(fig.47).

Estos resultados indican que los efectos de COX-1 y COX-2 sobre la liberación de NO endotelial están modulados por los niveles de hormonas sexuales femeninas endógenas. El incremento de NO en hembras controles en presencia de SC-560, apoyaría la sugerencia de que los prostanoides que participan en la respuesta a ACh fueran vasodilatadores predominantemente.

El detrimento en la liberación de NO en hembras ovariectomizadas en presencia de ambos

**Figura 47:** Efecto del NS-398 (10  $\mu$ M) y SC-560 (50 nM) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y estimulada por ACh. El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. \*  $p < 0,05$  frente a la liberación basal de NO; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$  frente a su correspondiente control.

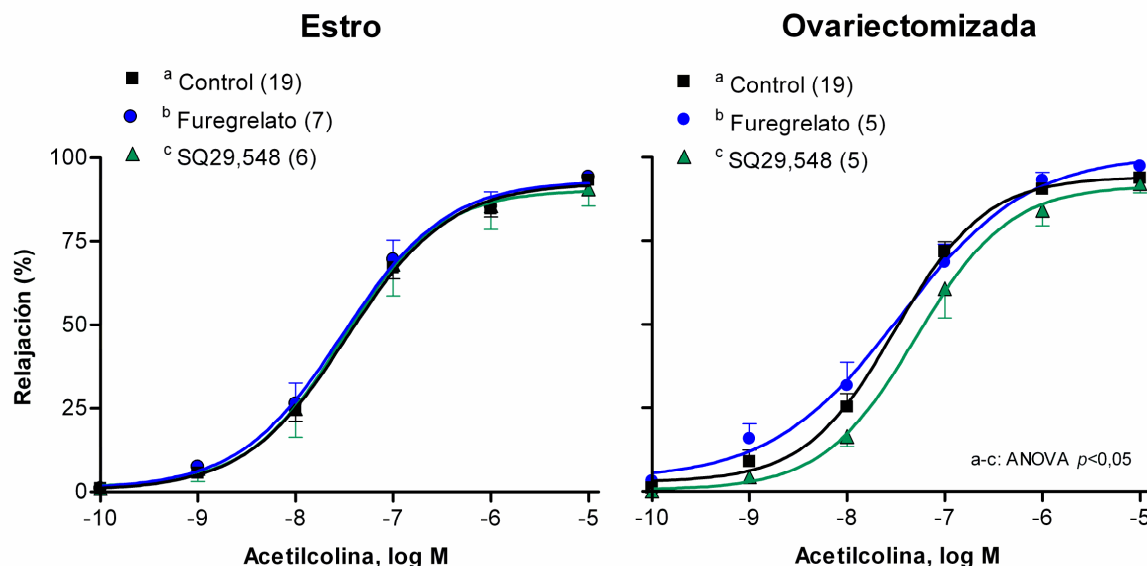
en arterias de ratas controles y ovariectomizadas.

### III.b1. Participación del TXA<sub>2</sub> en la respuesta inducida por la ACh.

Para analizar el posible papel funcional del TXA<sub>2</sub> se realizaron curvas de ACh en presencia de furegrelato (1  $\mu$ M), inhibidor específico de la síntesis del TXA<sub>2</sub> o de SQ29,548 (1  $\mu$ M),



agonista del receptor TP. Observamos que ninguno de los dos fármacos modificaba la relajación inducida por ACh en arterias de animales controles. En arterias de ratas ovariectomizadas el furegrelato no modificó la respuesta vasodilatadora a ACh mientras que el SQ29,548 la disminuyó (fig.48, tabla 19).



**Figura 48:** Efecto del furegrelato (0,1  $\mu$ M) y SQ29,548 (10  $\mu$ M) sobre las curvas concentración-respuesta inducidas por ACh en segmentos de aorta de hembras controles y ovariectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción con 5-HT 1 Mm (control,  $807 \pm 69$  mg; control + furegrelato,  $1020 \pm 69$  mg; control + SQ29,548,  $880 \pm 84$  mg; ovariectomizadas,  $935 \pm 56$  mg; ovariectomizadas + furegrelato,  $1008 \pm 87$  mg; ovariectomizadas + SQ29,548,  $925 \pm 160$  mg). El número de animales está indicado entre paréntesis.

**Tabla 19.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log  $EC_{50}$  a ACh en aorta de ratas control y ovariectomizadas.

	Control		Ovariectomizada	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b>Control</b>	$92,4 \pm 3,2$	$-7,4 \pm 0,06$	$94,15 \pm 2,3$	$-7,5 \pm 0,07$
<b>Furegrelato</b>	$93,21 \pm 3,8$	$-7,5 \pm 0,11$	$100,9 \pm 5,1$	$-7,4 \pm 0,14$
<b>SQ29,548</b>	$90,39 \pm 5,6$	$-7,5 \pm 0,17$	$91,53 \pm 4,1$	$-7,2 \pm 0,11$ <sup>#</sup> *

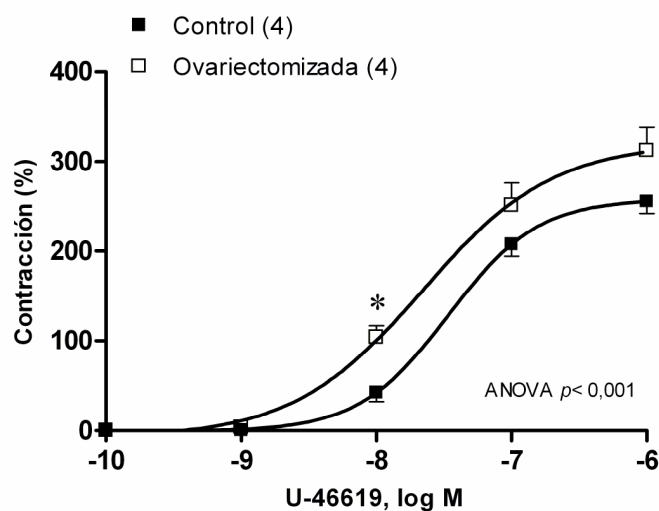
\*  $p < 0,05$  vs ratas control; <sup>#</sup>  $p < 0,05$  vs condición control en ratas ovariectomizadas.

Estos resultados parecen indicar que el TXA<sub>2</sub> no participa en la respuesta a ACh en hembras en estro ni en ovariectomizadas y además que en estas últimas existen otros prostanoides vasoconstrictores implicados que no actúan a través de los TP.

En cualquier caso no se puede descartar cambios en la respuesta vasomotora y/o en la liberación del TXA<sub>2</sub>.

### Reactividad vascular al TXA<sub>2</sub>

Para estudiar la posible variación en la sensibilidad al TXA<sub>2</sub>, se realizaron curvas concentración-respuesta al mimético del TXA<sub>2</sub>, U-46619 (0,1 nM- 1  $\mu$ M), obteniendo una contracción dependiente de concentración mayor en hembras ovariectomizadas que en sus controles (fig.49, tabla 20).



**Figura 49:** Curvas concentración-respuesta al mimético del TXA<sub>2</sub>, U-46619 (0,1 nM- 1  $\mu$ M) en aortas de hembras estro y ovariectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) están expresados en porcentaje de la contracción de KCl 75mM (control, 1232  $\pm$  81 mg; ovariectomizadas, 1387  $\pm$  134 mg). El número de animales está indicado entre paréntesis. \* $p$ <0,05 comparando con la situación control.

**Tabla 20.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de contracción) y el log EC<sub>50</sub> a U-46619 en aorta de ratas control y ovariectomizadas.

	Control		Ovariectomizada	
	$E_{max}$ (%)	log EC <sub>50</sub>	$E_{max}$ (%)	log EC <sub>50</sub>
<b>U-46619</b>	258,4 $\pm$ 10,7	-7,46 $\pm$ 0,07	321,2 $\pm$ 24,8 *	-7,65 $\pm$ 0,14

\*  $p$ < 0,05 vs ratas control.

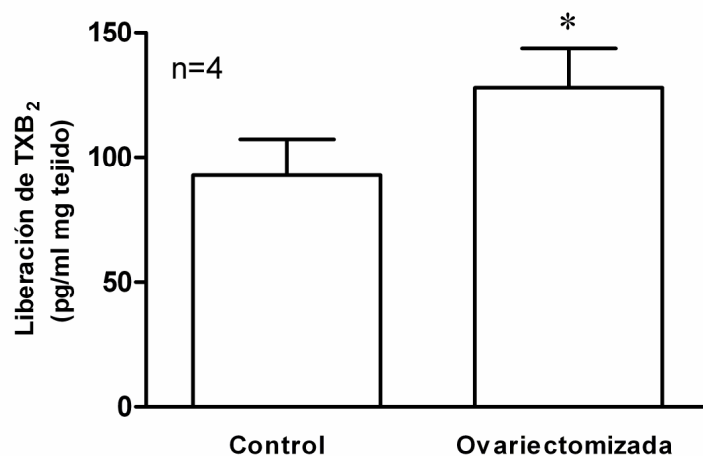
Estos resultados estarían de acuerdo con lo publicado por Karanian y col. que defienden que los receptores de prostanoïdes están regulados hormonalmente en aorta de rata (Karanian y col., 1981). En mesentérica se ha publicado un incremento en la sensibilidad de

los receptores de TP debida a la ovariectomía (Davidge y Zang, 1998). Esto difiere con lo publicado por Li y Stallone dónde la pérdida de hormonas sexuales femeninas produce un detrimento en la contracción a U-46619 (Li y Stallone, 2005).

La respuesta contráctil a U-46619 fue significativamente mayor en hembras que en machos como ya se había publicado en aorta (Li y Stallone, 2005) y en arterias pulmonares (Farhat y Ramwell, 1992) de rata. De hecho, estudios previos en cultivos de células musculares lisas de aorta de rata describen que el número de lugares de unión del  $\text{TXA}_2$  por célula es mayor en hembras que en machos (Matsuda y col., 1995), resultados que explicarían la mayor sensibilidad al U-46619.

#### Liberación de $\text{TXA}_2$ inducida por ACh

Se midió la producción de  $\text{TXB}_2$ , metabolito estable de  $\text{TXA}_2$  inducida por ACh (0,1 nM – 10  $\mu\text{M}$ ). Se obtuvo un ligero incremento en la producción de  $\text{TXA}_2$  en hembras ovariectomizadas (fig.50). Sin embargo, también se debe tener en cuenta que el incremento de este prostanoide fue mucho mayor en situación basal.

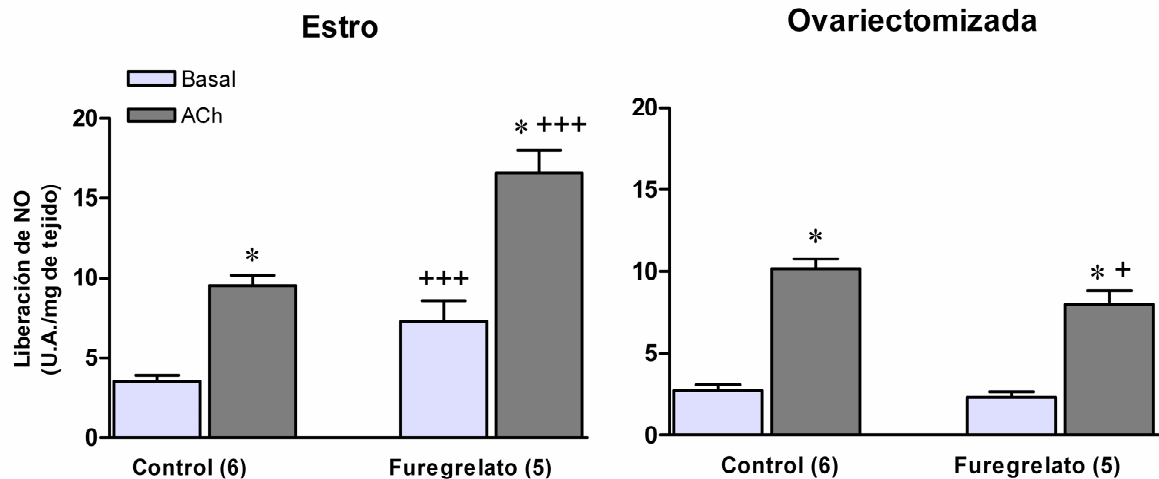


**Figura 50:** Liberación de  $\text{TXB}_2$  inducido por ACh (0,1 nM – 10  $\mu\text{M}$ ) en aorta de hembras control y ovariectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresaron como pg  $\text{TXB}_2$ /ml mg tejido. Siendo n el número de animales. \* $p < 0,05$  comparando con la situación control.

#### Participación del $\text{TXA}_2$ en la liberación de NO endotelial.

Con el fin de analizar la posible interacción entre el  $\text{TXA}_2$  y la liberación del NO inducida por ACh, se incubaron las arterias de ambos grupos de animales con furegrelato, inhibidor

de la síntesis de  $\text{TXA}_2$ . En presencia de furegrelato se incrementó la liberación de NO tanto basal como estimulada por ACh en arterias de hembras en estro mientras que la disminuyó en arterias de ratas ovariectomizadas (fig.51).



**Figura 51:** Efecto del furegrelato (1  $\mu\text{M}$ ) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y la estimulada con ACh (0,1 nM – 10  $\mu\text{M}$ ). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. \*  $p < 0,05$  frente a la liberación basal de NO; +  $p < 0,05$ , +++  $p < 0,001$  frente a su correspondiente control.

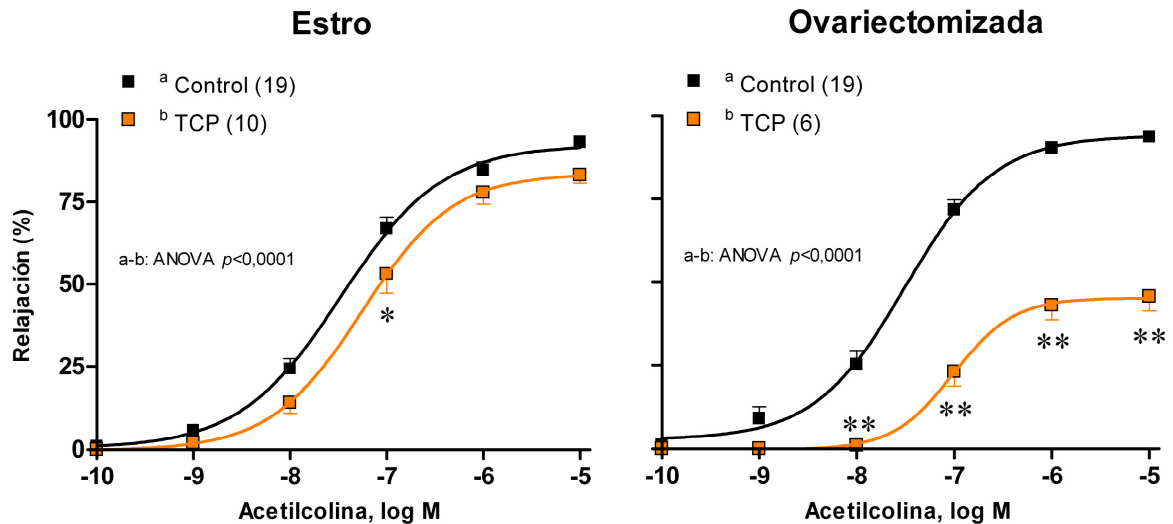
El incremento de la liberación de NO endotelial en hembras controles al inhibirse la síntesis del  $\text{TXA}_2$  indica que existe una estrecha relación entre la síntesis de factores vasocontráctiles y vasodilatadores que regula la homeostasis vascular. De hecho se ha descrito que la activación de los receptores TP producen entre otros efectos la inhibición de la AC (Hirata y col., 1996), por tanto se podría hipotetizar que la inhibición del  $\text{TXA}_2$  incrementa la liberación de NO vía AMPc.

Por el contrario, la ovariectomía reduce la liberación de NO en ausencia de  $\text{TXA}_2$  y tal vez por eso la relajación a ACh con furegrelato no incrementa en este grupo, o tal vez porque estén implicados otros prostanoïdes, los cuales se analizarán a continuación.

### III.b2. Participación de $\text{PGI}_2$ en la respuesta inducida por la ACh.

Continuando con el estudio, investigamos el efecto del inhibidor de la síntesis de  $\text{PGI}_2$ , TCP (10  $\mu\text{M}$ ), en la respuesta inducida por ACh. Observamos que la presencia de TCP

disminuyó la respuesta vasodilatadora a ACh en mayor medida en las arterias de hembras ovariectomizadas que en estro (fig.52, tabla 21).



**Figura 52:** Efecto del TCP (10  $\mu$ M) sobre las curvas concentración-respuesta inducidas por ACh (0,1 nM - 10  $\mu$ M) en segmentos de aorta de hembras control y castradas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción con 5-HT, 1  $\mu$ M (control,  $807 \pm 69$ ; control + TCP,  $985 \pm 81$  mg; ovariectomizadas,  $935 \pm 56$  mg; ovariectomizadas + TCP,  $1102 \pm 329$  mg). El número de animales está indicado entre paréntesis. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  frente a su correspondiente control.

**Tabla 21.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log  $EC_{50}$  a ACh en aorta de ratas control y ovariectomizadas.

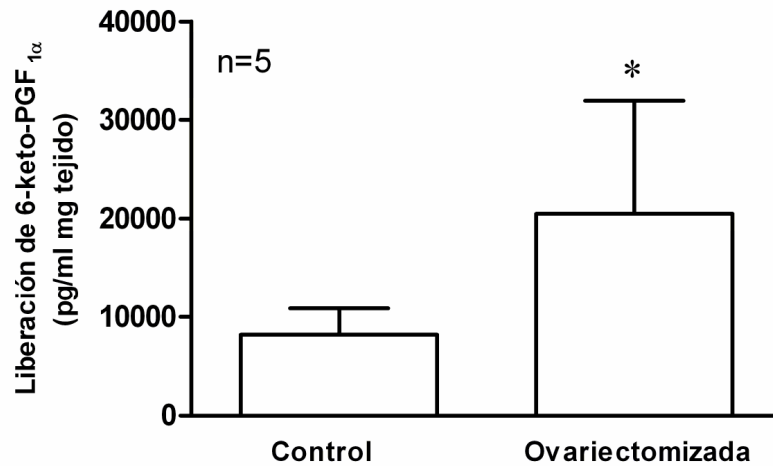
	Control		Ovariectomizada	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b>Control</b>	$92,19 \pm 2,3$	$-7,47 \pm 0,06$	$93,53 \pm 2,5$	$-7,48 \pm 0,07$
<b>TCP</b>	$83,81 \pm 3,1^+$	$-7,26 \pm 0,09$	$45,24 \pm 2,7^{* \#}$	$-7,01 \pm 0,09^{\#}$

\*  $p < 0,05$  vs ratas control;  $^+ p < 0,05$  vs condición control en ratas control;  $^{\#} p < 0,001$  vs condición control en ratas ovariectomizadas.

Este resultado, en un principio, sugiere una mayor participación de  $PGI_2$  con efecto vasodilatador en arterias de ratas ovariectomizadas, a través de su síntesis y/o efecto vasomotor. Sin embargo, no se puede descartar la modulación en la síntesis de otros factores cuando la producción de  $PGI_2$  está bloqueada.

#### Liberación de $PGI_2$ inducida por ACh

Para analizar el efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre la liberación de la  $\text{PGI}_2$  en la respuesta a ACh, se midió la producción de su metabolito estable 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  inducida por ACh (0,1 nM – 10  $\mu\text{M}$ ). Los resultados obtenidos muestran una síntesis mayor de 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  estimulada por ACh en hembras ovariectomizadas (fig.53).



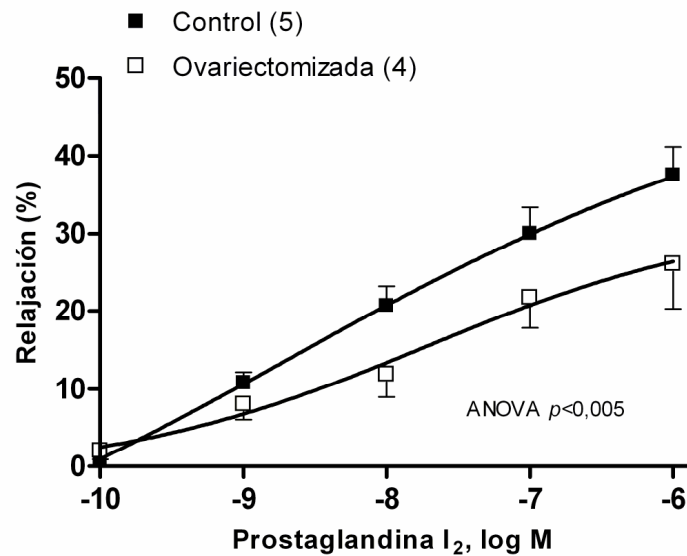
**Figura 53:** Liberación de 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  inducida por ACh en aorta de hembras control y ovariectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresaron como pg 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ /ml mg tejido. Siendo n el número de animales. \* $p < 0,05$  frente a su correspondiente control.

Estos resultados concuerdan con lo publicado en aorta de ratas ovariectomizadas donde se ve un incremento en la síntesis de  $\text{PGI}_2$  (Lennon y Poyser, 1987) y un detrimento de la síntesis de la misma en conejos tratados con estrógenos (Elam y col., 1980).

Sin embargo, existen publicaciones donde la síntesis vascular de  $\text{PGI}_2$  aumenta cuando los niveles de estrógenos son altos (Zamorano y col., 1994; Chang y col., 1980). En cultivos de células endoteliales de vena umbilical en humanos los estrógenos inducen la expresión de COX-2, incrementando  $\text{PGI}_2$  (Pedram y col., 2002; Akarasereenont y col., 2000). El incremento de  $\text{PGI}_2$  observado en ovariectomizadas va acompañado del incremento de  $\text{TXA}_2$  como sucedía en aortas de machos orquidectomizados.

#### Reactividad vascular a $\text{PGI}_2$

Con el fin de determinar posibles diferencias en la sensibilidad a  $\text{PGI}_2$  se realizaron curvas concentración-respuesta a  $\text{PGI}_2$  (0,1 nM- 1  $\mu\text{M}$ ). Se obtuvo una mayor relajación en hembras controles que en castradas  $p < 0,05$  (fig.54, tabla 22).



**Figura 54:** Curvas concentración-respuesta al Prostaglandina I<sub>2</sub> en aortas de hembras control y ovariectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) están expresados en porcentaje de la contracción con 5-HT 1  $\mu$ M (control, 709  $\pm$  52 mg; ovariectomizadas, 763  $\pm$  65 mg). El número de animales está indicado entre paréntesis.

**Tabla 22.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log EC<sub>50</sub> a PGI<sub>2</sub> en aorta de ratas control y ovariectomizadas.

	Control		Ovariectomizada	
	$E_{max}$ (%)	log EC <sub>50</sub>	$E_{max}$ (%)	log EC <sub>50</sub>
PGI <sub>2</sub>	35 $\pm$ 2,16	-8,13 $\pm$ 0,18	25,83 $\pm$ 3,2 *	-7,75 $\pm$ 0,3 *

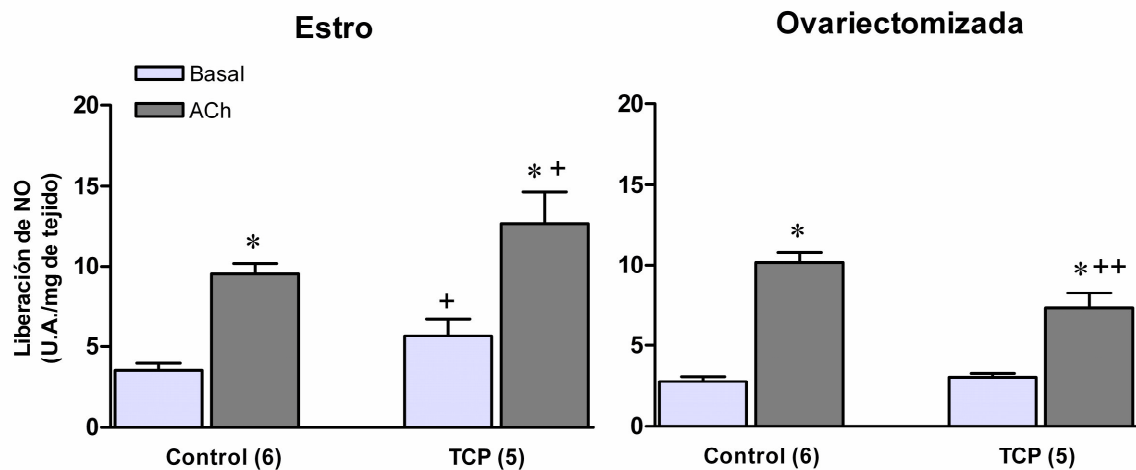
\*  $p < 0,05$  vs ratas control.

La interacción de la PGI<sub>2</sub> con sus receptores IP induce la unión del GTP a la proteína Gs que activa la subunidad catalítica de la AC, resultando en una conversión de ATP a AMPc. Puesto que se ha publicado que el activador de la AC, forskolina, produce relajaciones idénticas en arteria mesentérica de ratas ovariectomizadas y tratadas con estrógenos, se podría sugerir que los estrógenos modulan la vía de transducción de la PGI<sub>2</sub> posiblemente al nivel de la proteína Gs. Esta hipótesis vendría avalada por publicaciones en las que se sugiere que los estrógenos regulan las funciones de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos tanto en tejido vascular (Ferrer y col., 1996) como hepático (Yagami y col., 1994) incrementando la expresión de la proteína Gs.

Este resultado confiere un papel cardioprotector a las hormonas sexuales femeninas en cuanto que incrementa la sensibilidad del músculo liso vascular a un agente vasodilatador.

*Participación de la PGI<sub>2</sub> en la liberación de NO inducida por ACh.*

La incubación con TCP produjo un incremento en la liberación basal e inducida por ACh de NO en animales controles mientras que la disminuyó en aortas de ovariectomizadas (fig.55).



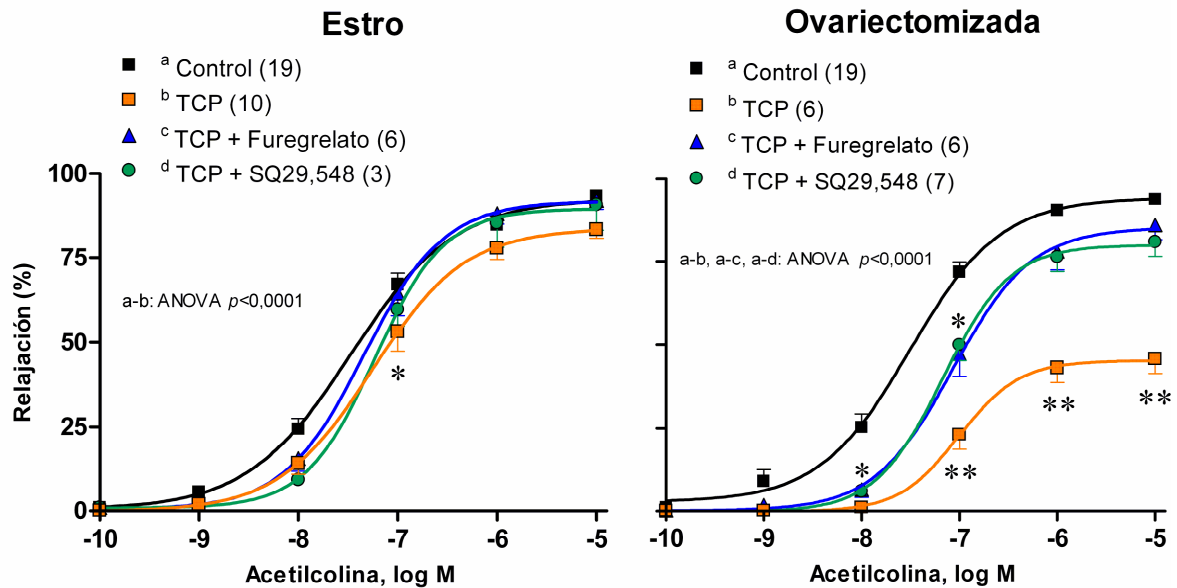
**Figura 55:** Efecto del TCP (10  $\mu$ M) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y la estimulación con ACh. El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.) por mg de tejido. \* $p$ <0,05 frente a la liberación basal de NO; + $p$ <0,05, ++ $p$ <0,01 frente a su correspondiente control.

Estos resultados muestran una vez más que el efecto de inhibir derivados de COX-2 en conjunto o de forma individual está regulada por los niveles de hormonas sexuales. También confieren un papel cardioprotector a los estrógenos puesto que en situaciones fisiopatológicas en las que la síntesis de PGI<sub>2</sub> esté reducida, la producción de NO también está disminuida en ausencia de hormonas sexuales femeninas. Probablemente el incremento del NO en controles sea el responsable, al menos en parte, de que la relajación a ACh no disminuya tanto en presencia de TCP, del mismo modo la disminución de NO en ovariectomizadas puede que contribuya a la gran disminución en la relajación a ACh en presencia de TCP. A pesar de estas consideraciones, no se puede descartar que se modifique la liberación/función de otros prostanoides.

Puesto que se ha descrito que la PGI<sub>2</sub> endógena puede modular las acciones cardiovasculares del TXA<sub>2</sub> in vivo (Cheng y col., 2002), el siguiente paso fue analizar efecto funcional de la inhibición de la síntesis de ambos prostanoides. Observamos que la coincubación de las arterias con TCP y furegrelato revirtió la disminución de la respuesta a



ACh causada por el TCP en arterias de ratas en estro, mostrando así la existencia de un balance entre  $\text{TXA}_2$  y  $\text{PGI}_2$  en estas arterias. Sin embargo, en arterias de ratas ovariectomizadas, la coincubación con TCP más furegrelato no revertió el detrimento de la respuesta vasodilatadora causada por el TCP, indicando la participación de otros prostanoides contráctiles distintos a la  $\text{PGI}_2$  y  $\text{TXA}_2$  que se manifiestan en ausencia de éstos (fig.56, tabla 23).



**Figura 56:** Efecto del TCP (10  $\mu\text{M}$ )+furegrelato (0,1  $\mu\text{M}$ ) y TCP (10  $\mu\text{M}$ ) + SQ29,548 (0,1  $\mu\text{M}$ ) sobre las curvas concentración-respuesta inducidas por ACh (0,1 nM - 10  $\mu\text{M}$ ) en segmentos de aorta de hembras control y castradas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) se expresan como porcentaje de la inhibición de la contracción con 5-HT, 1  $\mu\text{M}$  (controles + TCP + furegrelato  $729 \pm 32$  mg; controles + TCP + SQ29,458  $781 \pm 67$  mg; ovariectomizadas + TCP + furegrelato  $929 \pm 149$  mg; castrados + TCP + SQ29,458  $916 \pm 64$  mg,  $p > 0,05$ ). El número de animales está indicado entre paréntesis. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente a su correspondiente control.

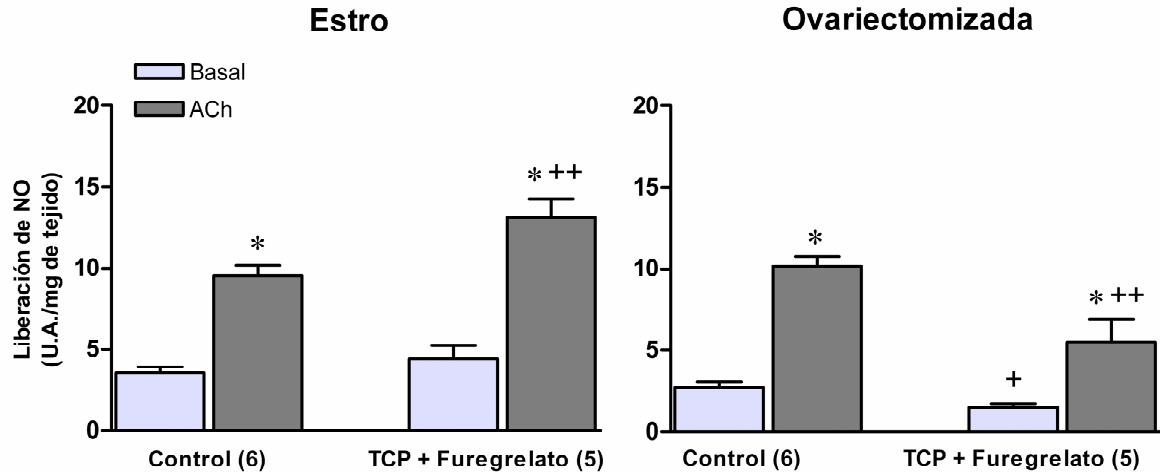
**Tabla 23.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{\text{max}}$ , expresada como porcentaje de relajación) y el log  $\text{EC}_{50}$  a ACh en aorta de ratas control y ovariectomizadas.

	Control		Ovariectomizada	
	$E_{\text{max}}$ (%)	log $\text{EC}_{50}$	$E_{\text{max}}$ (%)	log $\text{EC}_{50}$
<b>Control</b>	$92,19 \pm 2,3$	$-7,47 \pm 0,06$	$93,53 \pm 2,5$	$-7,48 \pm 0,07$
<b>TCP + Furegrelato</b>	$91,74 \pm 2,8$	$-7,34 \pm 0,07$	$85,38 \pm 3,9^{\#}$	$-7,06 \pm 0,09^{\#}$
<b>TCP + SQ29,548</b>	$89,49 \pm 3,6$	$-7,23 \pm 0,09$	$83,50 \pm 2,5^{\#}$	$-7,16 \pm 0,06^{\#}$

\*  $p < 0,05$  vs ratas control;  $^+ p < 0,01$  vs condición control en ratas control;  $^{\#} p < 0,001$  vs condición control en ratas ovariectomizadas.

El TCP puede reducir la relajación tanto por la inhibición de  $\text{PGI}_2$  vasodilatadora, como por producir un incremento de su precursor  $\text{PGH}_2$  que es capaz de activar los receptores TP produciendo vasoconstricción (Mais y col., 1985; Ogletree y col., 1985). Se comprobó por tanto si estos prostanoides activan también los receptores TP y para ello coincubamos el TCP con SQ29,548, el efecto fue similar al obtenido con TCP + furegrelato, lo que indica que sólo el  $\text{TXA}_2$  activa los TP (fig.56). Este resultado nos indica que deben existir otros agentes vasocontráctiles involucrados en la respuesta a ACh que no activen necesariamente los receptores TP y/o que exista una disminución de factores vasodilatadores. Por tanto se estudió la liberación de NO en presencia de estos inhibidores.

En hembras controles la incubación con TCP + furegrelato no registró diferencias significativas en la liberación basal, sin embargo, observamos un incremento de la liberación de NO estimulada por ACh en presencia de estos fármacos. En hembras castradas, la incubación con TCP + furegrelato disminuyó la liberación de NO tanto basal como la estimulada por ACh (fig.57).



**Figura 57:** Efecto del furegrelato (1  $\mu\text{M}$ ) + TCP (10  $\mu\text{M}$ ) sobre la liberación de NO de origen endotelial basal y la estimulación con ACh (0,1 nM – 10  $\mu\text{M}$ ). El número de animales utilizado se indica entre paréntesis. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia arbitrarias (U.A.) frente a mg de tejido. \*  $p < 0,05$  frente a la liberación basal de NO; +  $p < 0,05$  ++  $p < 0,01$  frente a su correspondiente control.

El incremento de la liberación de NO en ausencia de  $\text{TXA}_2$ , de  $\text{PGI}_2$  o de ambos a la vez en hembras en estro nos dota de otro argumento a favor del papel cardioprotector de las hormonas sexuales femeninas. Respecto a las hembras castradas observamos una

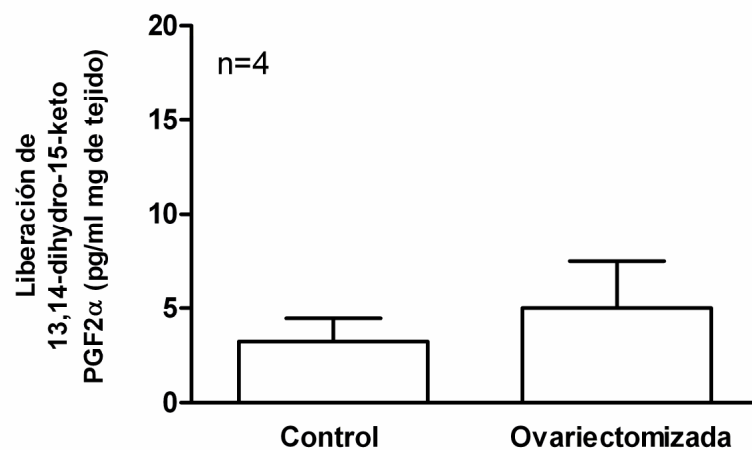
disminución de NO en presencia de TCP, furegrelato o ambos a la vez, resultado que podría contribuir a la menor relajación a ACh que observamos en todos los casos en este grupo de animales en presencia de los inhibidores de prostanoides.

### III.b3. Participación de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la respuesta inducida por la ACh.

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  derivada del endotelio juega un papel importante en la regulación del tono vascular en numerosas alteraciones vasculares. Sus efectos son mediados por dos subtipos de receptores específicos,  $\text{FP}_A$  y  $\text{FP}_B$  (Srinivasan y col., 2002) localizados en el músculo liso vascular produciendo vasoconstricción.

#### Liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ inducida por ACh

Para analizar el efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre la liberación de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en la respuesta a ACh, se midió la producción de su metabolito estable 13,14-dihidro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$  inducida por ACh (0,1 nM – 10  $\mu\text{M}$ ). La liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inducida por ACh fue similar entre ambos grupos de animales (fig.58).

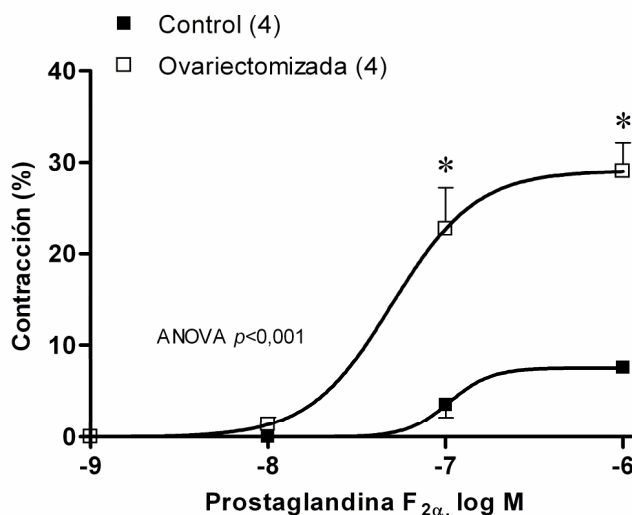


**Figura 58:** Producción de 13,14-dihidro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$  inducida por ACh (0,1 nM – 10  $\mu\text{M}$ ) en segmentos de aorta de macho control y orquidectomizado. Resultados (media  $\pm$  EEM) están expresados como pg 13,14-dihidro-15-keto  $\text{PGF}_{2\alpha}$  /ml mg tejido. Siendo n el número de animales.

Estos resultados difieren de lo publicado por Zamorano y col. (1995) dónde la producción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se veía incrementada en hembras ovariectomizadas. Dado los bajos valores de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  encontrados en nuestras condiciones experimentales, nos hacen suponer que la repercusión funcional sea también escasa.

### Reactividad vascular a $\text{PGF}_{2\alpha}$

La realización de curvas concentración respuesta a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  produjo una mayor respuesta contráctil en aortas de ratas ovariectomizadas que en controles (fig.59, tabla 24).



**Figura 59:** Curvas concentración-respuesta  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (1 nM- 1  $\mu\text{M}$ ) en aortas de ratas hembras en estro y ovariectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) están expresados en porcentaje de la contracción de KCl 75 mM (control,  $1120 \pm 75$  mg; ovariectomizadas,  $1137 \pm 107$  mg). El número de animales está indicado entre paréntesis. \* $p < 0,01$  frente a su correspondiente control.

**Tabla 24.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{\max}$ , expresada como porcentaje de contracción) y el log  $\text{EC}_{50}$  a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en aorta de ratas control y ovariectomizadas.

	Control		Ovariectomizada	
	$E_{\max}$ (%)	log $\text{EC}_{50}$	$E_{\max}$ (%)	log $\text{EC}_{50}$
<b><math>\text{PGF}_{2\alpha}</math></b>	$7,5 \pm 1,4$	$-6,98 \pm 0,6$	$29,11 \pm 0,24$ *	$-7,29 \pm 0,24$ *

\*  $p < 0,001$  vs ratas control.

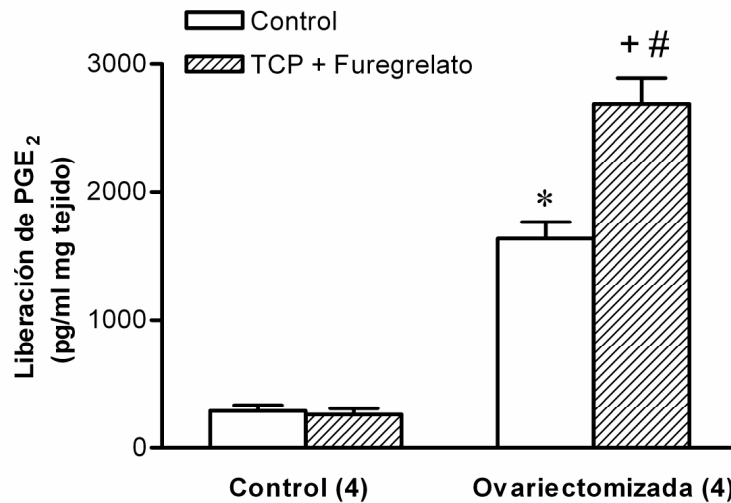
Esta mayor contracción  $\text{PGF}_{2\alpha}$  podría ser la responsable, junto a la disminución de NO, de la disminución de la respuesta a ACh en presencia de TCP + SQ29,548 .

### **III.b4. Participación de la $\text{PGE}_2$ en la respuesta inducida por la ACh.**

Puesto que la producción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en hembras en estro y ovariectomizadas es reducida y que además de la activación de los receptores FP, en la relajación a ACh en presencia de TCP y SQ29,548 pueden estar participando receptores EP que dependiendo del subtipo produce vasoconstricción o vasodilatación. Por ello, se analizó la liberación de  $\text{PGE}_2$  inducida por ACh y el efecto vasomotor de  $\text{PGE}_2$ .

Liberación de PGE<sub>2</sub> inducida por ACh

La liberación inducida por ACh de PGE<sub>2</sub> fue mayor en hembras ovariectomizadas que en controles (fig.60).



**Figura 60:** Producción de PGE<sub>2</sub> inducida por ACh (0,1 nM – 10  $\mu$ M) en segmentos de aorta de macho control y orquidectomizado; efecto del TCP (1 $\mu$ M) + furegrelato (1 $\mu$ M) en la producción de PGE<sub>2</sub> inducida por ACh. Resultados (media  $\pm$  EEM) están expresados como pg PGE<sub>2</sub>/ml mg tejido. Siendo n el número de animales. \* $p < 0,0001$  frente al control correspondiente; + $p < 0,01$  comparando las arterias en ausencia de TCP y furegrelato; # $p < 0,0001$  comparando con arterias de ratas ovariectomizadas en presencia de TCP + furegrelato.

El que la liberación de PGE<sub>2</sub> sea mayor en ovariectomizadas podría justificar la disminución de la respuesta a ACh en ausencia de PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> en arterias de ratas ovariectomizadas. Estos resultados difieren de lo publicado en cultivos de células endoteliales humanas, dónde los estrógenos inducen la expresión de COX-2, incrementando la síntesis de PGE<sub>2</sub> (Pedram y col., 2002). Sin embargo, no hay que olvidar que en nuestras condiciones experimentales existe una mayor producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en ovariectomizadas (Sagredo y col., 2008) que pudiera estar activando la síntesis de derivados de COX-2.

Es importante tener en cuenta que la PGE<sub>2</sub> deriva de PGH<sub>2</sub>, molécula muy lábil y difícil de cuantificar. Se ha descrito que la formación de PGH<sub>2</sub> puede verse incrementada en ovariectomizadas de modo que contribuye al efecto vasoconstrictor en este grupo, pues como ya ha sido publicado anteriormente, la ovariectomía incrementa la expresión y actividad de PGH sintasa (Kawaguchi y col., 1995) y la sensibilidad a este prostanoide (Davidge y Zhang, 1998). Otras publicaciones avalan lo anterior proponiendo la hipótesis de que el tratamiento con estrógenos podría disminuir los niveles de PGH<sub>2</sub> (Ospina y col., 2003).

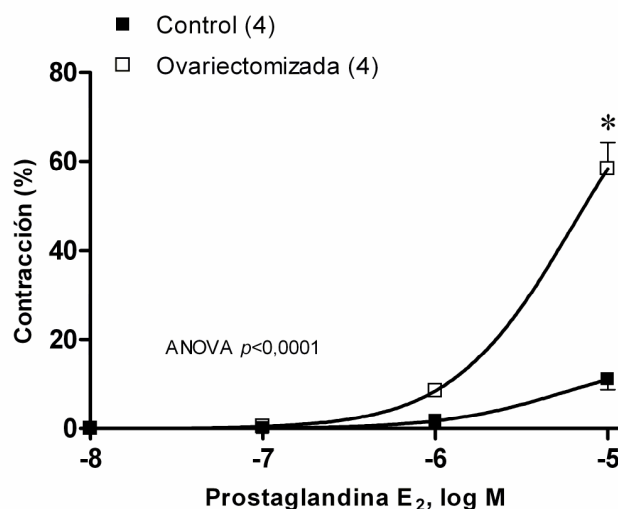
Se continuó el estudio analizando el efecto de los inhibidores de la síntesis de  $\text{TXA}_2$  y  $\text{PGI}_2$  en la liberación de  $\text{PGE}_2$  inducida por ACh con el fin de determinar si al inhibir la síntesis de dichos prostanoides se incrementa la producción de su precursor  $\text{PGH}_2$ , y por consiguiente de  $\text{PGE}_2$ .

En presencia de TCP y furegrelato la ACh indujo un incremento en la producción de  $\text{PGE}_2$  sólo en el caso de ratas ovariectomizadas (fig.60). El incremento de  $\text{PGE}_2$  en ausencia de  $\text{PGI}_2$  y  $\text{TXA}_2$  podría explicar la disminución de la relajación a ACh en presencia de sus inhibidores en arterias de ovariectomizadas, a través de la contracción producida al activar los receptores  $\text{EP}_1$  y  $\text{EP}_3$  (Funk y col., 1993; Coleman y col., 1994, Jadhav y col., 2004). Adicionalmente, la disminución de la liberación de NO en ausencia de  $\text{PGI}_2$  y  $\text{TXA}_2$  también podría contribuir a la disminución de la respuesta a ACh en presencia de TCP + furegrelato.

Por tanto la deficiencia de estrógenos puede exacerbar la liberación y función de los prostanoides vasoconstrictores observados en diferentes condiciones fisiopatológicas (Davidge, 2001).

#### Reactividad vascular a $\text{PGE}_2$

Con el fin de determinar posibles diferencias en la sensibilidad a  $\text{PGE}_2$  se realizaron curvas concentración-respuesta a  $\text{PGE}_2$  (1 nM- 10  $\mu\text{M}$ ). Los resultados muestran una contracción dependiente de concentración incrementada en hembras ovariectomizadas  $p < 0,001$  (fig.61, tabla 24).



**Figura 61:** Curvas concentración-respuesta  $\text{PGE}_2$  en aortas de hembras en estro y ovariectomizadas. Los resultados (media  $\pm$  EEM) están expresados en porcentaje de la contracción de KCl 75 mM (control,  $1238 \pm 105$  mg; ovariectomizadas,  $1243 \pm 145$  mg). El número de animales está indicado entre paréntesis. \* $p < 0,001$  frente a su correspondiente control.

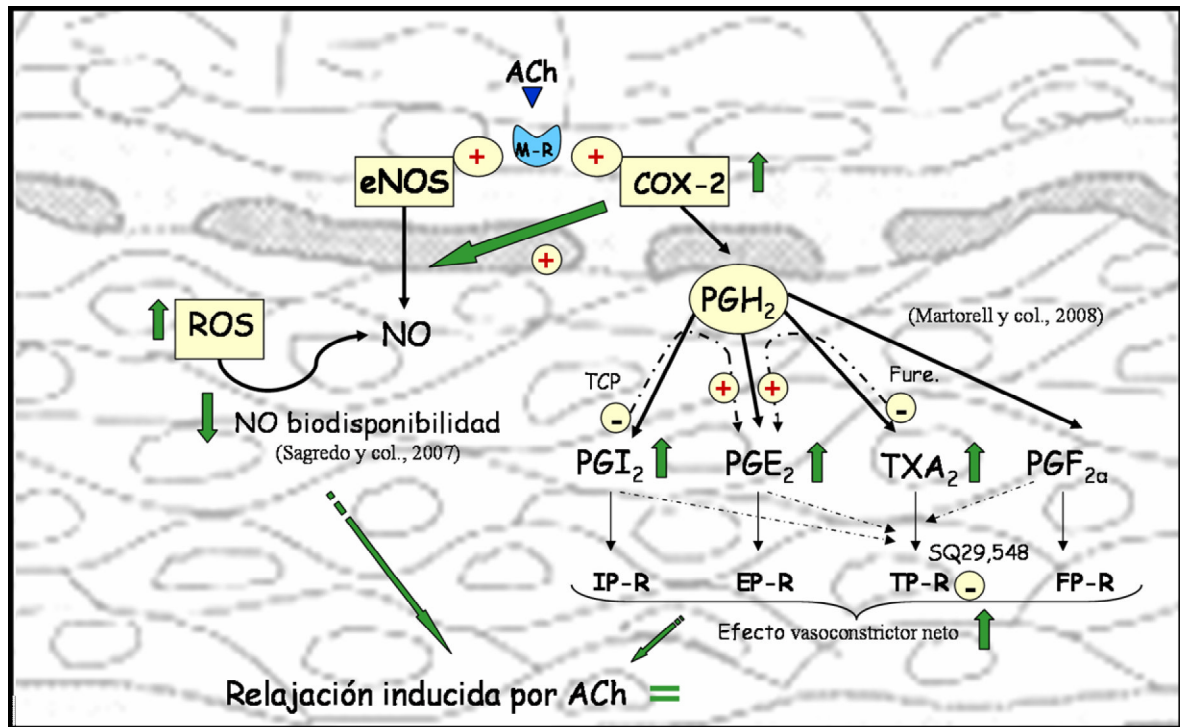
**Tabla 24.** Cambios en la respuesta máxima ( $E_{max}$ , expresada como porcentaje de contracción) y el log  $EC_{50}$  a  $PGE_2$  en aorta de ratas control y ovariectomizadas.

	Control		Ovariectomizada	
	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	log $EC_{50}$
<b><math>PGE_2</math></b>	$16,33 \pm 1,36$	$-5,23 \pm 7,4$	$89,93 \pm 4,4 *$	$-5,21 \pm 4,47$

\*  $p < 0,001$  vs ratas control.

Se ha descrito que modestas variaciones en la expresión y sensibilidad de los receptores EP pueden provocar alteraciones fisiológicas en la respuesta a  $PGE_2$ , en lo que a esto respecta se ha publicado que el tratamiento con estrógenos reduce la densidad de los receptores responsables de la respuesta vasoconstrictora  $EP_1$  y  $EP_3$  facilitando el efecto vasodilatador de  $EP_2$  y  $EP_4$  (Schmitz y col., 2006). Es posible, hipotetizar que la diferencia en la sensibilidad a este prostanoides en ambos grupos sea debida a alteraciones en la expresión de sus receptores. Este incremento de la sensibilidad del músculo liso vascular a un agente vasoconstrictor en hembras ovariectomizadas confiere un papel vasoprotector a las hormonas sexuales femeninas.

En resumen, este estudio demuestra que la ovariectomía incrementa la expresión de COX-2, e induce un desequilibrio en la producción de prostanooides vasoconstrictores y vasodilatadores, siendo los prostanooides vasoconstrictores los predominantes. Anteriormente, se ha descrito un incremento en la producción de aniones superóxido en aortas de ratas ovariectomizadas (Sagredo y col., 2008) que disminuye la biodisponibilidad del NO. Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, la respuesta vasodilatadora a ACh no se ve modificada en aortas de ratas ovariectomizadas, probablemente como consecuencia de mecanismos compensatorios, que podrían incluir una regulación positiva de la liberación de NO endotelial a través de derivados de COX-2 (fig.62).



**Figura 62:** Esquema que muestra el efecto de la ovarectomía sobre la relajación inducida por la ACh. El esquema muestra que la ovarectomía incrementa la expresión de COX-2 y que cuando la ACh activa los receptores muscarínicos (M-R) se induce la liberación de PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>; la ovarectomía incrementa la liberación de PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub>. Adicionalmente, cuando se inhibe la síntesis de PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> por TCP y furegrelato, respectivamente, la liberación de PGE<sub>2</sub> se incrementa, y la ovarectomía incrementa este efecto. Estos prostanoideos a través de sus respectivos receptores específicos ejercen un efecto vasoconstrictor neto en ratas ovariectomizadas. A pesar de estas modificaciones, la respuesta inducida por ACh no se ve modificada en aortas de ratas ovariectomizadas.

En resumen, este estudio comparativo sobre la influencia de las hormonas sexuales endógenas en machos y en hembras sobre la liberación/función de prostanoideos y NO endotelial nos provee de un argumento más a favor del papel cardioprotector de las hormonas sexuales endógenas en los dos sexos. Los efectos vasculares observados en ratas orquidectomizadas parecen depender de testosterona, mientras que en ratas ovariectomizadas se observó una disminución parcial de estradiol. Este resultado podría indicar: (1) la participación de otras hormonas y/o factores de origen gonadal y/o (2) que el sistema cardiovascular femenino fuera más sensible a la disminución de estradiol que el sistema cardiovascular masculino a la de testosterona.

Adicionalmente, el estudio pone de manifiesto la existencia de distintas vías de señalización que actúan simultáneamente para mantener una función vascular adecuada.



## **Conclusiones**

Las conclusiones concretas obtenidas en el presente estudio, realizado en aorta de rata, muestran que en la respuesta inducida por ACh la privación de hormonas sexuales:

- No modifica la participación del NO endotelial ni en machos ni en hembras, ya que no altera
  - la expresión de la eNOS, y
  - la liberación y función del NO endotelial.
- Modula la participación de derivados de COX-2, ya que
  - incrementa la expresión de COX-2, tanto en machos como en hembras,
  - incrementa la liberación de TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> en machos y en hembras; e incrementa la de PGF<sub>2α</sub> sólo en machos.
  - disminuye el efecto vasodilatador de PGI<sub>2</sub> tanto en machos como en hembras,
  - incrementa el efecto vasoconstrictor del TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> en hembras y sólo el de PGE<sub>2</sub> en machos.
- Modula el efecto de los distintos prostanoïdes sobre la síntesis de NO, ya que
  - la liberación de NO está regulada positivamente sólo por el TXA<sub>2</sub> en aorta de ratas macho,
  - la liberación de NO en ratas hembra está regulada positivamente por TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y demás prostanoïdes derivados de COX-2.

Las hormonas sexuales endógenas confieren un papel protector sobre el sistema cardiovascular en cuanto a la liberación y función de prostanoïdes derivados de COX-2 en sus respectivos sexos. Sin embargo, a pesar de estas modificaciones, la respuesta vasodilatadora inducida por ACh está incrementada o no modificada en aortas de ratas orquitectomizadas u ovariectomizadas, respectivamente a través de distintos mecanismos compensatorios.

## **Bibliografía**

- ABDEL-LATIF A.A. (2001): Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp. Biol. Med.*, 226, 153-163.
- ADIE E.J., MULLANEY I., MCKENZIE F.R., MILLIGAN G. (1992): Concurrent down-regulation of IP prostanoid receptors and the alpha-subunit of the stimulatory guanine-nucleotide-binding protein (Gs) during prolonged exposure of neuroblastoma x glioma cells to prostanoid agonists. Quantification and functional implications. *Biochem. J.*, 285, 529-536.
- AIKAWA K., SUGINO T., MATSUMOTO S., CHICHESTER P., WHITBECK C., LEVIN R.M. (2003): The effect of ovariectomy and estradiol on rabbit bladder smooth muscle contraction and morphology. *J. Urol.*, 170, 634-637.
- AJAYI A.A., HALUSHKA P.V. (2005): Castration reduces platelet thromboxane A2 receptor density and aggregability. *QJM.*, 98, 349-356.
- AKARASEREENONT P., TECHATRAISAK K., THAWORN A., CHOTEWUTTAKORN S. (2000): The induction of cyclooxygenase-2 by 17beta-estradiol in endothelial cells is mediated through protein kinase C. *Inflamm. Res.*, 49, 460-465.
- ALBERTS B., BRY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. (1992): *Molecular biology of the cell*. Barcelona: Ediciones Omega.
- ALDERTON W.K., COOPER C.E., KNOWLES R.G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 357, 593-615.
- ALLEN A.M., ZHUO J., MENDELSON F.A. (2000): Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am. J. Hypertens.*, 13, 31-38.
- AMMAR E.M., SAID S.A., HASSAN M.S. (2004): Enhanced vasoconstriction and reduced vasorelaxation induced by testosterone and nandrolone in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacol. Res.*, 50, 253-259.
- ANDERSON D.C. (1974): Sex hormone-binding globulin. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 3, 69-96.
- ARNOULD T., THIBAUT-VERCRUYSEN R., BOUAZIZ N., DIEU M., REMACLE J., MICHIELS C. (2001): PGF(2alpha), a prostanoid released by endothelial cells activated by hypoxia, is a chemoattractant candidate for neutrophil recruitment. *Am. J. Pathol.*, 159(1), 345-357.
- BACHSCHMID M., SCHILDKNECHT S., ULLRICH V. (2005): Redox regulation of vascular prostanoid synthesis by the nitric oxide-superoxide system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 536-542.
- BAKER P.J., RAMEY E.R., RAMWELL P.W. (1978): Androgen-mediated sex differences of cardiovascular responses in rats. *Am. J. Physiol.*, 235, H242-H246.
- BARBAGALLO M., SHAN J., PANG P.K., RESNICK L.M. (1995): Effects of dehydroepiandrosterone sulfate on cellular calcium responsiveness and vascular contractility. *Hypertension*, 26, 1065-1069.
- BARBER D.A., MILLER V.M. (1997): Gender differences in endothelium-dependent relaxations do not involve NO in porcine coronary arteries. *Am. J. Physiol.*, 273, H2325-H2332.
- BARNES P.J., LIU S.F. (1995): Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol. Rev.*, 47, 87-131.
- BEATO M., KLUG J. (2000): Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update*, 6, 225-236.
- BÉKESI G., KAKUCS R., VARBIRO S., RACZ K., SPRINTZ D., FEHER J., SZEKACS B. (2000): In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids*, 65, 889-894.
- BLANCO-RIVERO J., BALFAGÓN G. & FERRER M. (2006a): Orchidectomy modulates alpha2-adrenoceptor reactivity in rat mesenteric artery through increased thromboxane A2 formation. *J. Vasc. Res.*, 43, 101-108.
- BLANCO-RIVERO J., BALFAGÓN G., FERRER M. (2005a): Male castration increases neuronal nitric oxide synthase activity in the rat mesenteric artery through protein kinase C activation. *J. Vasc. Res.*, 42, 526-534.
- BLANCO-RIVERO J., CACHOFEIRO V., LAHERA V., ARAS-LOPEZ R., MARQUEZ-RODAS I., SALAICES M., XAVIER F.E., FERRER M., BALFAGÓN G. (2005b): Participation of

- prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*, 46, 107-112.
- BLANCO-RIVERO J., MÁRQUEZ-RODAS I., XAVIER F., ARAS-LÓPEZ R., VILLA-ARROYO I., FERRER M., BALFAGÓN G. (2007b): Long-term fenofibrate treatment impairs endothelium-dependent dilation to acetylcholine by altering cyclooxygenase pathway. *Cardiovas. Res.*, 75, 398-407.
- BLANCO-RIVERO J., SAGREDO A., BALFAGÓN G., FERRER M. (2006b): Orchidectomy increase expression and activity of Cu/Zn-superoxide dismutase, while decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *J. Endocrinol.*, 190, 771-778.
- BLANCO-RIVERO J., SAGREDO A., BALFAGÓN G., FERRER M. (2007a): Protein kinase C activation increases endothelial nitric oxide release in mesenteric arteries from orchidectomized rats. *J. Endocrinol.*, 192, 189-197.
- BOLOTINA V.M., NAJIBI S., PALACINO J.J., PAGANO P.J., COHEN R.A. (1994): Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368, 850-853.
- BORDA E., CHAUD M., GUTNISKY R., CONTRERAS ORTIZ N., GIMENO M.F., GIMENO A.L. (1983): Relationships between prostaglandins and estrogens on the motility of isolated rings from the rat urinary bladder. *J. Urol.*, 129, 1250-1253.
- BOS C.L., RICHEL D.J., RITSEMA T., PEPPELENBOSCH M.P., VERSTEEG H.H. (2004): Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36, 1187-1205.
- BOWEN R., HASLAM R.J. (1991): Effects of nitrovasodilators on platelet cyclic nucleotide levels in rabbit blood; role for cyclic AMP in synergistic inhibition of platelet function by SIN-1 and prostaglandin E1. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 17, 424-433.
- BOWLES D.K. (2001): Gender influences coronary L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current and adaptation to exercise training in miniature swine. *J. Appl. Physiol.*, 91, 2503-2510.
- BRANDES R.P., MUGGE A. (1997): Gender differences in the generation of superoxide anions in the rat aorta. *Life Sci.*, 60, 391-396.
- BRAUN M., HOHLFELD T., KIENBAUM P., WEBER A.A., SARBIA M., SCHROR K. (1993): Antiatherosclerotic effects of oral cicaprost in experimental hypercholesterolemia in rabbits. *Atherosclerosis*, 103, 93-105.
- BREDT D.S., HWANG P.M., SNYDER S.H. (1990): Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347, 768-770.
- BRIONES A.M., ALONSO M.J., HERNANZ R., TOVAR S., VILA E., SALAICES M. (2002): Hypertension alters the participation of contractile prostanoids and superoxide anions in lipopolysaccharide effects on small mesenteric arteries. *Life Sci.*, 71, 1997-2014.
- BRIONES A.M., SALAICES M., VILA E. (2005): Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1 $\beta$  exposure in mesenteric resistance arteries. *Mech. Ageing. Dev.*, 126, 710-721.
- BROEKAERT A., GODFRAIND T. (1979): A comparison of the inhibitory effect of cinnarizine and papaverine on the noradrenaline- and calcium-evoked contraction of isolated rabbit aorta and mesenteric arteries. *Eur. J. Pharmacol.*, 53, 281-288.
- BUÑAG R.D. (1974): Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J. Appl. Physiol.*, 34, 279-282.
- BUSH T.L., BARRET-CONNOR E., COWAN L.D., CRIQUI M.H., WALLACE R.B., SUCHINDRAN C.M. (1987): Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-Up Study. *Circulation*, 75, 1102-1109.
- BUZZARD C.J., PFISTER S.L., CAMPBELL W.B. (1993): Endothelium-dependent contractions in rabbit pulmonary artery are mediated by thromboxane A2. *Circ. Res.*, 72, 1023-34.
- CAI H., HARRISON D.G. (2000): Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.*, 87, 840-844.

- CAMPBELL W.B., GEBREMEDHIN D., PRATT P.F., HARDER D.R. (1996): Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.*, 78, 415-423.
- CASTILLO C., ARIZNAVARRETA M.C., LAHERA V., CACHOFEIRO V., GIL-LOYZAGA P., TRESGUERRES J.A. (2005): Effects of ovariectomy and growth hormone administration on body composition and vascular function and structure in old female rats. *Biogerontology*, 6, 49-60.
- CATELLA-LAWSON F., CROFFORD L.J. (2001): Cyclooxygenase inhibition and thrombogenicity. *Am. J. Med.*, 110 Suppl 3A, 28S-32S.
- CAUGHEY G.E., CLELAND L.G., GAMBLE J.R., JAMES M.J. (2001): Up-regulation of endothelial cyclooxygenase-2 and prostanoid synthesis by platelets. Role of thromboxane A2. *J. Biol. Chem.*, 276, 37839-37845.
- CHAMBLISS K.L., YUHANNA I.S., MINEO C., LIU P., GERMAN Z., SHERMAN T.S., MENDELSON M.E., ANDERSON R.G., SHAUL P.W. (2000): Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ. Res.*, 87, E44-E52.
- CHANG W., KAKAO J., ORIMO H., MUROTA S. (1980): Stimulation of prostaglandin cyclooxygenase and prostacyclin synthetase activities by estradiol in rat aortic smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 620, 472-482.
- CHATRATH R., RONNINGEN K.L., SEVERSON S.R., LABRECHE P., JAYACHANDRAN M., BRACAMONTE M.P., MILLER V.M. (2003): Endothelium-dependent responses in coronary arteries are changed with puberty in male pigs. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 285, H1168-1176.
- CHEN L., SALAFRANCA M.N., MEHTA J.L. (1997): Cyclooxygenase inhibition decreases nitric oxide synthase activity in human platelets. *Am. J. Physiol.*, 273, H1854-1859.
- CHENG D.Y., FENG C.J., KADOWITZ P.J., GRUETTER C.A. (1994): Effects of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in female rat aorta. *Life Sci.*, 55, PL187-191.
- CHENG L.P., KUWAHARA M., JACOBSON J., FOEGH M.L. (1991): Inhibition of myointimal hyperplasia and macrophage infiltration by estradiol in aorta allografts. *Transplantation*, 52, 967-972.
- CHENG Y., AUSTIN S.C., ROCCA B., KOLLER B.H., COFFMAN T.M., GROSSER T., LAWSON A., FITZGERALD G.A. (2002): Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science*, 296, 539-541.
- CHOI S.B., JANG J.S., PARK S. (2005): Estrogen and exercise may enhance beta-cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats. *Endocrinology*, 146, 4786-4794.
- CHOU T.M., SUDHIR K., HUTCHISON S.J., KO E., AMIDON T.M., COLLINS P., CHATTERJEE K. (1996): Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation*, 94, 2614-2619.
- CHUNG H.Y., KIM H.J., KIM J.W., YU B.P. (2001): The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 928, 327-335.
- CIGNARELLA A., BOLEGO C., PINNA C., ZANARDO R., EBERINI I., PUGLISI L. (2000a): The influence of sex hormones on vascular responses in the aorta of streptozotocin-diabetic male rats. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, 361, 514-520.
- CIGNARELLA A., BOLEGO C., PINNA C., ZANARDO R., NARDI F., ZANCAN V., PUGLISI L. (2000b): Androgen deprivation, estrogen treatment and vascular function in male rat aorta. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, 361, 166-172.
- COHEN R.A., WEISBROD R.M., GERICKE M., YAGHOUBI M., BIERL C., BOLOTINA V.M. (1999): Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and inhibition of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *Circ. Res.*, 84, 210-219.

- COLEMAN R.A., SMITH W.L., NARUMIYA S. (1994): International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.*, 46, 205-229.
- COLUCCI W.S., GIMBRONE M.A. J.R., MCLAUGHLIN M.K., HALPERN W., ALEXANDER R.W. (1982): Increased vascular catecholamine sensitivity and alpha-adrenergic receptor affinity in female and estrogen-treated male rats. *Circ. Res.*, 50, 805-811.
- CONRAD K.P., MOSHER M.D., BRINCK-JOHNSEN T., COLPOYS M.C. (1994): Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on pressor responses in conscious ovariectomized rats. *Am. J. Physiol.*, 266, R1267-1272.
- COOKE J.P., DZAU V.J. (1997): Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu. Rev. Med.*, 48, 489-509.
- COSTARELLA C.E., STALLONE J.N., RUTECKI G.W., WHITTIER F.C. (1996): Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277, 34-39.
- CRACOWSKI J.L., CAMUS L., DURAND T., DEVILLIER P., GUY A., HARDY G., STANKE-LABESQUE F., ROSSI J.C., BESSARD G. (2002): Response of rat thoracic aorta to F(2)-isoprostane metabolites. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 39, 396-403.
- DAVIDGE S.T. (2001): Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ. Res.*, 89, 650-660.
- DAVIDGE S.T., ZHANG Y. (1998): Estrogen replacement suppresses a prostaglandin H synthase-dependent vasoconstrictor in rat mesenteric arteries. *Circ. Res.*, 83, 388-395.
- DE GASPARO M., WHITEBREAD S., MELE M., MOTANI A.S., WHITCOMBE P.J., RAMJOUE H.P., KAMBER B. (1990): Biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 16, S31-35.
- DE MORAES S., CARVALHO J.C., CAVALCANTE M.T., MATHIAS R.S. (1997): Hypoxia and response of human umbilical artery strips to 5-hydroxytryptamine: role of prostaglandin F2 alpha. *Gen. Pharmacol.*, 28, 77-83.
- DEENADAYALU V.P., WHITE R.E., STALLONE J.N., GAO X., GARCIA A.J. (2001): Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 281, H1720-1727.
- DHALLA N.S., TEMSAH R.M., NETTICADAN T. (2000): Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Hypertension*, 18, 655-673.
- DILLON P.F., AKSOY M.O., DRISKA S.P., MURPHY R.A. (1981): Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science*, 211, 495-498.
- DORN G.W. 2ND, BECKER M.W., DAVIS M.G. (1992): Dissociation of the contractile and hypertrophic effects of vasoconstrictor prostanoids in vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, 267, 24897-24905.
- DU X.J., DART A.M., RIEMERSMA R.A. (1994): Sex differences in the parasympathetic nerve control of heart. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 21, 485-493.
- DUCKLES S.P., KRAUSE D.N. (2007): Cerebrovascular effects of oestrogen: multiplicity of action. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 34, 801-808.
- ECKLY A.E., STOCLET J.C., LUGNIER C. (1994): Isoprenaline induces endothelium-independent relaxation and accumulation of cyclic nucleotides in the rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 271, 237-240.
- EDWARDS G., DORA K.A., GARDENER M.J., GARLAND C.J., WESTON A.H. (1998): K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, 396, 269-272.
- ELAM M.B., LIPSCOMB G.E., CHESNEY C.M., TERRAGNO D.A., TERRAGNO N.A. (1980): Effect of synthetic estrogen on platelet aggregation and vascular release of PGI<sub>2</sub>-like material in the rabbit. *Prostaglandins*, 20, 1039-1051.
- ESTRADA M., ESPINOSA A., MULLER M., JAIMOVICH E. (2003): Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 144, 3586-3897.
- ESTRADA M., LIBERONA J.L., MIRANDA M., JAIMOVICH E. (2000): Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 279, E132-139.

- EVANS R.M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240, 889-895.
- FARHAT M.Y., LAVIGNE M.C., RAMWELL P.W. (1996): The vascular protective effects of estrogen. *Faseb J.*, 10, 615-624.
- FARHAT M.Y., RAMWELL P.W. (1992): Estradiol potentiates the vasopressor response of the isolated perfused rat lung to the thromboxane mimic U-46619. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261, 686-691.
- FELETOU M., VANHOUTTE P.M. (2006): Endothelium derived hyperpolarizing factor. Where are now?. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 1215-1225.
- FENG L., XIA Y., GARCIA G.E., HWANG D., WILSON C.B. (1995): Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.*, 95, 1669-1675.
- FERRER M., ENCABO A., MARÍN J., BALFAGÓN G. (1994): Chronic treatment with the anabolic steroid, nandrolone, inhibits vasodilator responses in rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 252, 233-241.
- FERRER M., ENCABO A., MARIN J., PEIRO C., REDONDO J., DE SAGARRA M.R., BALFAGON G. (1992): Comparison of the vasoconstrictor responses induced by endothelin and phorbol 12,13-dibutyrate in bovine cerebral arteries. *Brain Res.*, 599, 186-196.
- FERRER M., MEYER M., OSOL G. (1996): Estrogen replacement increases beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat mesenteric arteries. *J. Vasc. Res.*, 33, 124-131.
- FERRER M., OSOL G. (1998): Estrogen replacement modulates resistance artery smooth muscle and endothelial  $\alpha_2$ -adrenoceptor reactivity. *Endothelium*, 6, 133-141.
- FERRER M., SÁNCHEZ M., MARTÍN M. DEL C., MÁRQUEZ-RODAS I., ALONSO M.J., SALAICES M., BALFAGÓN G. (2004): Protein kinase A increases electrical stimulation-induced neuronal nitric oxide release in rat mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.*, 487, 167-73.
- FERRER M., TEJERA N., MARÍN J., BALFAGON G. (1999): Androgen deprivation facilitates acetylcholine-induced relaxation by superoxide anion generation. *Clin. Sci.*, 97, 625-631.
- FIGARD H., GAUME V., MOUGIN F., DEMOUGEOT C., BERTHELOT A. (2006): Beneficial effects of isometric strength training on endothelial dysfunction in rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 31, 621-630.
- FITZGERALD G.A. (1991): Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *Am. J. Cardiol.*, 68, 11B-15B.
- FLEMING I., GRAY G.A., SCHOTT C., STOCLET J.C. (1991): Inducible but not constitutive production of nitric oxide by vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 200, 375-376.
- FLETCHER S.W., COLDITZ G.A. (2002): Failure of estrogen plus progestin therapy for prevention. *J.A.M.A.*, 288, 366-368.
- FORADORI C.D., WEISER M.J., HANDA R.J. (2007): Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol.* En prensa.
- FORTUNO A., RODRÍGUEZ A., GÓMEZ-AMBROSI J., MUÑIZ P., SALVADOR J., DIEZ J., FRUHBECK G. (2002): Leptin inhibits angiotensin II-induced intracellular calcium increase and vasoconstriction in the rat aorta. *Endocrinology*, 143, 3555-3560.
- FREIN D., SCHILDKNECHT S., BACHSCHMID M., ULLRICH V. (2005): Redox regulation: a new challenge for pharmacology. *Biochem. Pharmacol.*, 70, 811-823.
- FRIDOVICH I. (1997): Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *J. Biol. Chem.*, 272, 18515-18517.
- FUNK C.D., FUNK L.B., KENNEDY M.E., PONG A.S., FITZGERALD G.A. (1991): Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.*, 5, 2304-2312.
- FUNK C.D., FURCI L., FITZGERALD G.A., GRYGORCZYK R., ROCHETTE C., BAYNE M.A., ABRAMOVITZ M., ADAM M., METTERS K.M. (1993): Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J. Biol. Chem.*, 268, 26767-26772.



- FURCHGOTT R. (1988): Studies on the relation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activable inhibitory factor from bovine retractor penis is organic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric. En *Mechanism of Vasodilatation*. ed. Vanhoutte P. pp. 31-36. New York: Raven Press.
- FURCHGOTT R., ZAWADZKI J. (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-376.
- FURUKAWA K., OHSIMA N., TAWADA-IWATA Y., SHIGEKAWA M. (1991): Cyclic GMP stimulates  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J. Biol. Chem.*, 266, 12337-12341.
- GAO Y., KAWANO K., YOSHIYAMA S., KAWAMICHI H., WANG X., NAKAMURA A., KOHAMA K. (2003): Myosin light chain kinase stimulates smooth muscle myosin ATPase activity by binding to the myosin heads without phosphorylating the myosin light chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 16-21.
- GARCÍA-PASCUAL A., LABADIA A., TRIGUERO D., COSTA G. (1996): Local regulation of oviductal blood flow. *Gen. Pharmacol.*, 27, 1303-1310.
- GECSE A., OTTLECH A., TELEGDY G. (1981): Regulation of brain prostaglandins by sexual steroids. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 57, 155-161.
- GERALDES P., SIROIS M.G., BERNATCHEZ P.N., TANGUAY J.F. (2002): Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22, 1585-1590.
- GERHARD M., GANZ P (1995): How do we explain the clinical benefits of estrogen? From bedside to bench. *Circulation*, 92, 5-8.
- GISCLARD V., MILLER V.M., VANHOUTTE P.M. (1988): Effect of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 19-22.
- GLUAIS P., EDWARDS G., WESTON A.H., FALCK J.R., VANHOUTTE P.M., FELETOU M. (2005a): Role of SK (Ca) and IK (Ca) in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery. *Br. J. Pharmacol.*, 144, 477-485.
- GLUAIS P., LONCHAMPT M., MORROW J.D., VANHOUTTE P.M., FELETOU M. (2005b): Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br. J. Pharmacol.*, 146, 834-45.
- GLUAIS P., PAYSANT J., BADIÉ-COMMANDER C., VERBEUREN T., VANHOUTTE P.M., FELETOU M. (2006): In SHR aorta, calcium ionophore A-23187 releases prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> as endothelium-derived contracting factors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291, H2255-2264.
- GLUAIS P., VANHOUTTE P.M., FÉLÉTOU M. (2007): Mechanisms underlying ATP-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 556, 107-114.
- GOLDEN K.L., MARSH J.D., JIANG Y., BROWN T., MOULDEN J. (2003): Gonadectomy of adult male rats reduces contractility of isolated cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 285, E449-453.
- GONZALES R.J., GHAFARI A.A., DUCKLES S.P., KRAUSE D.N. (2005): Testosterone treatment increases thromboxane function in rat cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 289, 578-585.
- GONZALES R.J., KRAUSE D.N., DUCKLES S.P. (2004): Testosterone suppresses endothelium-dependent dilation of rat middle cerebral arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 286, 552-60.
- GONZALES R.J., WALKER B.R., KANAGY N.L. (2001): 17beta-estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 280, L555-564.
- GOVERS R., RABELINK T.J. (2001): Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 280, F193-206.
- GUYTON A., HALL J. (2006): *Tratado de Fisiología Médica*. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana.
- HAGEMANN C., RAPP U.R. (1999): Isotype-specific functions of raf kinases. *Exp. Cell Res.*, 253, 34-46.

- HAMPL V., HERGET J. (2000): Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary *Hypertension Physiol. Rev.*, 80, 1337-1372.
- HARRISON D.G. (1994): Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Basic Res. Cardiol.*, 89, 87-102.
- HATHAWAY D.R., EATON C.R., ADELSTEIN R.S. (1981): Regulation of human platelet myosin light chain kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Nature*, 291, 252-256.
- HAYASHI T., FUKUTO J.M., IGNARRO L.J., CHAUDHURI G. (1992): Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 89, 11259-11263.
- HEINLEIN C.A., CHANG C. (2002): The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol. Endocrinol.*, 16, 2181-2187.
- HENRION D., DECHAUX E., DOWELL F.J., MACLOUR J., SAMUEL J.L., LEVY B.I., MICHEL J.B. (1997): Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2. *Br. J. Pharmacol.*, 121, 83-90.
- HENRION D., DECHAUX E., DOWELL F.J., MACLOUR J., SAMUEL J.L., LEVY B.I., MICHEL J.B. (1997): Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2. *Br. J. Pharmacol.*, 121, 83-90.
- HENRION D., KUBIS N., LÉVY B.I. (2001): Physiological and pathophysiological functions of the AT<sub>2</sub> subtype receptor of angiotensin II. From large arteries to the microcirculation. *Hypertension*, 38, 1150-1157.
- HERMENEGILDO C., OVIEDO P.J., CANO A. (2006): Cyclooxygenases regulation by estradiol on endothelium. *Curr. Pharm. Des.*, 12, 205-215.
- HIGASHIURA K., BLANEY B., MORGAN E., MATHUR R.S., HALUSHKA P.V. (1996): Inhibition of testosterone 5 alpha-reductase: evidence for tissue-specific regulation of thromboxane A<sub>2</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 279, 1386-1391.
- HIGASHIURA K., MATHUR R.S., HALUSHKA P.V. (1997): Gender-related differences in androgen regulation of thromboxane A<sub>2</sub> receptors in rat aortic smooth-muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 29, 311-315.
- HIGGS E.A., MONCADA S. (1983): Prostacyclin-physiology and clinical uses. *Gen. Pharmacol.*, 14, 7-11.
- HIRATA M., KOHSE K.P., CHANG C.H., IKEBE T., MURAD F. (1990): Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 265, 1268-1273.
- HIRATA T., USHIKUBI F., KAKIZUKA A., OKUMA M., NARUMIYA S. (1996): Two thromboxane A<sub>2</sub> receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J. Clin. Invest.*, 97, 949-956.
- HISHIKAWA K., NAKAKI T., MARUMO T., SUZUKI H., KATO R., SARUTA T. (1995): Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS. Lett.*, 360, 291-293.
- HOBBS AJ, HIGGS A, MONCADA S. (1999) Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39, 191-220.
- HODGES Y.K., TUNG L., YAN X.D., GRAHAM J.D., HORWITZ K.B., HORWITZ L.D. (2000): Estrogen receptors alpha and beta: prevalence of estrogen receptor beta mRNA in human vascular smooth muscle and transcriptional effects. *Circulation*, 101, 1792-1798.
- HONDA H., UNEMOTO T., KOGO H. (1999): Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 34, 1232-1236.
- HORIUCHI M., AKISHITA M., DZAU V.J. (1999): Recent Progress in Angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*, 33, 613-621.
- HOROWITZ A., MENICE C.B., LAPORTE R., MORGAN K.G. (1996): Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.*, 76, 967-1002.

- HUTCHISON S.J., SUDHIR K., CHOU T.M., SIEVERS R.E., ZHU B.Q., SUN Y.P., DEEDWANIA P.C., GLANTZ S.A., PARMLEY W.W., CHATTERJEE K. (1997): Testosterone worsens endothelial dysfunction associated with hypercholesterolemia and environmental tobacco smoke exposure in male rabbit aorta. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 29, 800-807.
- IGNARRO L., KADOWITZ P.J. (1985): The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in the vascular smooth muscle relaxation. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 25, 171-191.
- IGNARRO L.J., BUGA G.M., WOOD K.S., BYRNS R.E., CHAUDHURI G. (1987): Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 9265-9269.
- ISHIZAKA N., GRIENDLING K.K., LASSEGUE B., ALEXANDER R.W. (1998): Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension*, 32, 459-466.
- JADHAV V., JABRE A., LIN S.Z., LEE T.J. (2004): EP1- and EP3-receptors mediate prostaglandin E2-induced constriction of porcine large cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 24, 1305-1316.
- JIANG C.W., SARREL P.M., LINDSAY D.C., POOLE-WILSON P.A., COLLINS P. (1991): Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 104, 1033-1037.
- JIANG J., BACKX P.H., TEOH H., WARD M.E. (2003): Role of Cl<sup>-</sup> currents in rat aortic smooth muscle activation by prostaglandin F2 alpha. *Eur. J. Pharmacol.*, 481, 133-140.
- JOHNSON B.D., ZHENG W., KORACH K.S., SCHEUER T., CATTERALL W.A., RUBANYI G.M. (1997): Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J. Gen. Physiol.* 110, 135-140.
- JONES R.D., HUGH JONES T., CHANNER K.S. (2004): The influence of testosterone upon vascular reactivity. *Eur. J. Endocrinol.*, 151, 29-37.
- JONES R.D., PUGH P.J., HALL J., CHANNER K.S., JONES T.H. (2003): Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse. *Eur. J. Endocrinol.*, 148, 111-120.
- JOSWIG M., HACH-WUNDERLE V., ZIEGLER R., NAWROTH P.P. (1999): Postmenopausal hormone replacement therapy and the vascular wall: mechanisms of 17 beta-estradiol's effects on vascular biology. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 107, 477-487.
- KAHONEN M., TOLVANEN J.P., SALLINEN K., WU X., PORSTI I. (1998): Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. *Am. J. Physiol.*, 275, H15-22.
- KANG S.M., JANG Y., KIM J.Y., CHUNG N., CHO S.Y., CHAE J.S., LEE J.H. (2002): Effect of oral administration of testosterone on brachial arterial vasoreactivity in men with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.*, 89, 862-864.
- KARANIAN J.W., MORAN F.M., RAMEY E.R., RAMWELL P.W. (1981): Gender differences in prostaglandin receptors of rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, 72, 10-12.
- KARPATI L., CHOW F.P., WOOLLARD M.L., HUTTON R.A., DANDONA P. (1980): Prostacyclin-like activity in the female rat thoracic aorta and the inferior vena cava after ethyloestradiol and norethisterone. *Clin. Sci. (Lond.)*, 59, 369-372.
- KAUSER K., RUBANYI G.M. (1994): Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae. *Am. J. Physiol.*, 267, H2311-2317.
- KAWAGUCHI M., PILBEAM C.C., VARGAS S.J., MORSE E.E., LORENZO J.A., RAISZ L.G. (1995): Ovariectomy enhances and estrogen replacement inhibits the activity of bone marrow factors that stimulate prostaglandin production in cultured mouse calvariae. *J. Clin. Invest.*, 96, 539-548.
- KLEIN T., ELTZE M., GREBE T., HATZELMANN A., KÖMHOFF M. (2007): Celecoxib dilates guinea-pig coronaries and rat aortic rings and amplifies NO/cGMP signaling by PDE5 inhibition. *Cardiovasc. Res.*, 75, 390-397.
- KOMORI K., SUZUKI H. (1987): Heterogenous distribution of muscarinic receptors in the rabbit saphenous artery. *Br. J. Pharmacol.*, 92, 657-664.

- KORITA D., ITOH H., SAGAWA N., YURA S., YOSHIDA M., KAKUI K., TAKEMURA M., FUJII S. (2004): 17beta-estradiol up-regulates prostacyclin production in cultured human uterine myometrial cells via augmentation of both cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase expression. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 11, 457-464.
- KOSAKA T., MIYATA A., IHARA H., HARA S., SUGIMOTO T., TAKEDA O., TAKAHASHI E., TANABE T. (1994): Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur. J. Biochem.*, 221, 889-897.
- KOWALA M.C., MAZZUCCO C.E., HARTL K.S., SEILER S.M., WARR G.A., ABID S., GROVE R.I. (1993): Prostacyclin agonists reduce early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters. Octimibate and BMY 42393 suppress monocyte chemotaxis, macrophage cholesteryl ester accumulation, scavenger receptor activity, and tumor necrosis factor production. *Arterioscler. Thromb.*, 13, 435-444.
- KRONE W., KLASS A., NAGELE H., BEHNKE B., GRETEN H. (1988): Effects of prostaglandins on LDL receptor activity and cholesterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leukocytes. *J. Lipid. Res.*, 29, 1663-1669.
- KUIPER G.G., CARLSSON B., GRANDIEN K., ENMARK E., HÄGGBLAD J., NILSSON S., GUSTAFSSON J.A. (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138, 863-870.
- KULMACZ R.J., WANG L.H. (1995): Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, 270, 24019-24023.
- LAHERA V., NAVARRO-CID J., MAESO R., CACHOFEIRO V. (1999): Participation of endothelium-derived vasoconstrictor factors in arterial hipertensión. *Rev. Esp. Cardiol.*, 52 (Supl III), 4-11.
- LAHERA V., NAVARRO-CID J., MAESO R., RUILOPE L.M., CACHOFEIRO V. (1998): Disfunción endotelial, dislipidemia y aterosclerosis: implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Cardiovascular risk factors*, 1, 14-22.
- LAURSEN J.B., RAJAGOPALAN S., GALIS Z., TARPEY M., FREEMAN B.A., HARRISON D.G. (1997): Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*, 95, 588-593.
- LE MELLAY V., GROSSE B., LIEBERHERR M. (1997): Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J. Biol. Chem.*, 272, 11902-11907.
- LEMIEUX C., PICARD F., LABRIE F., RICHARD D., DESHAIES Y. (2003): The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet- and ovariectomy-induced obesity. *Obes. Res.*, 11, 477-490.
- LENNON E.A., ANSELL I., DAVIES G.C., POYSER N.L. (1988): The effect of age and smoking on vascular prostaglandin production in men and women. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.*, 32, 15-21.
- LENNON E.A., POYSER N.L. (1987): Studies on the prostaglandin synthesizing capacity of several blood vessels from male and female rats. *Prostaglandins Leukot. Med.*, 27, 15-26.
- LI M., KUO L., STALLONE J.N. (2002): Estrogen enhances contractile responses of rat aorta by upregulating expression of cyclooxygenase-2 and thromboxane synthase. *Circulation*, 106, 211.
- LIM., STALLONE J.N. (2005): Estrogen potentiates vasopressin-induced contraction of female rat aorta by enhancing cyclooxygenase-2 and thromboxane function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 289, H1542-1550.
- LI Y.J., DUCKLES S.P. (1992): Effect of endothelium on the action of sympathetic and sensory nerves in the perfused rat mesentery. *Eur. J. Pharmacol.*, 210, 23-40.
- LI Y.J., ZHUN H., STRANSBURY K.H., TRUSH M.A. (1997): *Oxygen Radicals and Disease process*, pp. 327-377. Amsterdam: Harwood Academic.
- LISSBRANT I.F., LISSBRANT E., PERSSON A., DAMBER J.E., BERGH A. (2003): Endothelial cell proliferation in male reproductive organs of adult rat is high and regulated by testicular factors. *Biol Reprod.*, 68, 1107-1111.

- LITTLETON-KEARNEY M., HURN P.D. (2004): Testosterone as a modulator of vascular behavior. *Biol. Res. Nurs.*, 5, 276-285.
- LIU D., DILLON J.S. (2002): Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha (i2,3). *J. Biol. Chem.*, 277, 21379-21388.
- LIU P.Y., DEATH A.K., HANDELSMAN D.J. (2003): Androgens and cardiovascular disease. *Endocr. Rev.*, 24, 313-340.
- LUCZAK K., BALCERCZYK A., SOSZYNSKI M., BARTOSZ G. (2004): Low concentration of oxidant and nitric oxide donors stimulate proliferation of human endothelial cells in vitro. *Cell Biol. Int.*, 28, 483-486.
- LÜSCHER T.F., VANHOUTTE P.M. (1990): *The endothelium: modulator of cardiovascular function*, pp. 1-23. Boca Ratón: CRC Press.
- MADDOX Y.T., FALCON J.G., RIDINGER M., CUNARD C.M., RAMWELL P.W. (1987): Endothelium-dependent gender differences in the response of the rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 240, 392-395.
- MAIS D.E., SAUSSY D.L. JR., CHAIKHOUNI A., KOHEL P.J., KNAPP D.R., HAMANAKA N., HALUSHKA P.V. (1985): Pharmacologic characterization of human and canine thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors in platelets and blood vessels: evidence for different receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233, 418-424.
- MANABE K., SHIRAHASE H., USUI H., KURAHASHI K., FUJIWARA M. (1989): Endothelium-dependent contractions induced by angiotensin I and angiotensin II in canine cerebral artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 251, 317-320.
- MANOLAGAS S.C., KOUSTENI S. (2001): Nonreproductive sites of action of reproductive hormones. *Endocrinology*, 142, 2200-2204.
- MARCUS A.J., WEKSLER B.B., JAFFE E.A., BROEKMAN M.J. (1980): Synthesis of prostacyclin from platelet-derived endoperoxides by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 66, 979-86.
- MARÍN J., BALFAGÓN G. (1998): Effect of clenbuterol on non-endothelial nitric oxide release in rat mesenteric arteries and the involvement of beta-adrenoceptors. *Br. Pharmacol.*, 124, 473-478.
- MARSDEN P.A., HENG H.H., SCHERER S.W., STEWART R.J., HALL A.V., SHI X.M., TSUI L.C., SCHAPPERT K.T. (1993): Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.*, 268, 17478-17488.
- MARTÍN M.C., BALFAGÓN G., MINOVES N., BLANCO-RIVERO J., FERRER M. (2005): Androgen deprivation increases neuronal nitric oxide metabolism and its vasodilator effect in rat mesenteric arteries. *Nitric oxide: Biology and Chemistry*, 12, 163-176.
- MARTIN W., FURCHGOTT R.F., VILLANI G.M., JOTHIANANDAN D. (1986): Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237, 529-538.
- MARTORELL A., BLANCO-RIVERO J., ARAS-LÓPEZ R., SAGREDO A., BALFAGÓN G., FERRER M. (2007): Orchidectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in the acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta. *Cardiovasc. Res.*, 77, 590-599.
- MATSUDA K., MATHUR R.S., ULLIAN M.E., HALUSHKA P.V. (1995): Sex steroid regulation of thromboxane A2 receptors in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Prostaglandins*, 49, 183-196.
- MATSUDA K., RUFF A., MORINELLI T.A., MATHUR R.S., HALUSHKA P.V. (1994): Testosterone increases thromboxane A2 receptor density and responsiveness in rat aortas and platelets. *Am. J. Physiol.*, 267, 887-893.
- MATZ R.L., DE SOTOMAYOR M.A., SCHOTT C., STOCLET J.C. ANDRIANTSITOHAINA R. (2000): Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br. J. Pharmacol.*, 131, 303-311.

- MAUGERI N., BERMEJO E., FALETTI A., SCHATTNER M.A., CHAUD M., GIMENO M.F., LAZZARI M.A. (1989): The influence of sex and different segments of thoracic aorta on bioactive aortic substance (BAS) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) synthesis. *Thromb. Res.*, 56, 19-27.
- MAYEUX P.R., MAIS D.E., CARR C., HALUSHKA P.V. (1989): Human erythroleukemia cells express functional thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 250, 923-927.
- MCDANIEL N.L., CHEN X.L., SINGER H.A., MURPHY R.A., REMBOLD C.M. (1992): Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and uncoupling stress from myosin phosphorylation. *Am. J. Physiol.*, 263, C461-C467.
- MEHROTRA S., GUPTA S., VILLALÓN C.M., BOOMSMA F., SAXENA P.R., MAASSEN-VANDENBRINK A. (2007): Rat carotid artery responses to alpha-adrenergic receptor agonists and 5-HT after ovariectomy and hormone replacement. *Headache*, 47, 236-246.
- MENDELSON C.R., SIMPSON E.R. (1987): Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells in vitro. *Mol. Cell Endocrinol.*, 52, 169-176.
- MERLIE J.P., FAGAN D., MUDD J., NEEDLEMAN P. (1988): Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.*, 263, 3550-3553.
- MERVAALA E.M., CHENG Z.J., TIKKANEN I., LAPATTO R., NURMINEN K., VAPAATALO H., MULLER D.N., FIEBELER A., GANTEN U., GANTEN D., LUFT F.C. (2001): Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension*, 37, 414-418.
- MEYER M.C., CUMMINGS K., OSOL G. (1997): Estrogen replacement attenuates resistance artery adrenergic sensitivity via endothelial vasodilators. *Am. J. Physiol.*, 272, 2264-2270.
- MICHEL T., FERON O. (1997): Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest.*, 100, 2146-2152.
- MIGGIN S.M., KINSELLA B.T. (2002): Regulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase Cascades by alpha - and beta -Isoforms of the Human Thromboxane A<sub>2</sub> Receptor. *Mol. Pharmacol.*, 61, 817-831.
- MILLER V.M., VANHOUTTE P.M. (1990): 17 beta-Estradiol augments endothelium-dependent contractions to arachidonic acid in rabbit aorta. *Am. J. Physiol.*, 258, R1502-1507.
- MINOVES N., BALFAGÓN G., FERRER M. (2002): Role of female sex hormones in neuronal nitric oxide release and metabolism in rat mesenteric arteries. *Clin. Sci. (Lond.)*, 103, 239-247.
- MITCHELL J.A., DE NUCCI G., WARNER T.D., VANE J.R. (1992): Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Br. J. Pharmacol.*, 105, 485-489.
- MITCHELL L.E., SPRECHER D.L., BORECKI I.B., RICE T., LASKARZEWSKI P.M., RAO D.C. (1994): Evidence for an association between dehydroepiandrosterone sulfate and Nonfatal, premature myocardial infarction in males. *Circulation*, 89, 89-93.
- MOLLACE V., MUSCOLI C., MASINI E., CUZZOCREA S., SALVEMINI D. (2005): Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol. Rev.*, 57, 217-252.
- MOMOI H., IKOMI F., OHHASHI T. (2003): Estrogen-induced augmentation of endothelium-dependent nitric oxide-mediated vasodilation in isolated rat cerebral small arteries. *Jpn. J. Physiol.*, 53, 193-203.
- MONCADA S., HIGGS E.A. (1991): Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.*, 21, 361-374.
- MORITA I., SCHINDLER M., REGIER M.K., OTTO J.C., HORI T., DEWITT D.L., SMITH W.L. (1995): Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, 270, 10902-10908.
- MUKHERJEE D., NISSEN S.E., TOPOL E.J. (2001a): Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA*, 286, 954-959.

- MUKHERJEE S., COAXUM S.D., MALEQUE M., DAS S.K. (2001b): Effects of oxidized low density lipoprotein on nitric oxide synthetase and protein kinase C activities in bovine endothelial cells. *Cell Mol. Biol.*, 47, 1051-1058.
- MUNZEL T., HEITZER T., HARRISON D.G. (1997): The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system. *Herz*, 22, 158-172.
- MURAKAMI M., NARABA H., TANIOKA T., SEMMYO N., NAKATANI Y., KOJIMA F., IKEDA T., FUEKI M., UENO A., OH S., KUDO I. (2000): Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, 275, 32783-32792.
- MURATA S., KIKKAWA K., NAGAO T. (1992): Cerebral vasodilating and spasmolytic actions of a new Ca-antagonist, clentiazem (TA-3090), in anesthetized animals. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 19, 790-797.
- MURPHY J.G., KHALIL R.A. (2000): Gender-specific reduction in contractility and  $[Ca^{2+}]_i$  in vascular smooth muscle cells of female rat. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 278, 834-844.
- MYERS S.I., TURNAGE R.H., BARTULA L., KALLEY B., MENG Y. (1996): Estrogen increases male rat aortic endothelial cell (RAEC) PGI<sub>2</sub> release. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 54, 403-409.
- NAKAO J., CHANGE W.C., MUROTA S.I., ORIMO H. (1981): Testosterone inhibits prostacyclin production by rat aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis*, 39, 203-209.
- NARUMIYA S., SUGIMOTO Y., USHUKUBI F. (1999): Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.*, 79, 1193-1226.
- NASEEM K.M. (2005): The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol. Aspects Med.*, 26, 33-65.
- NAWATE S., FUKAO M., SAKUMA I., SOMA T., NAGAI K., TAKIKAWA O., MIWA S., KITABATAKE A. (2005): Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy. *Br. J. Pharmacol.*, 144, 178-189.
- NELSON M.T., PATLAK J.B., WORLEY J.F., STANDEN N.B. (1990): Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.*, 259, 3-18.
- NIE D., LAMBERTI M., ZACHAREK A., LI L., SZEKERES K., TANG K., CHEN Y., HONN K.V. (2000): Thromboxane A<sub>2</sub> regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267, 245-251.
- NIELSEN K.C., OWMAN C. (1971): Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res.*, 27, 33-42.
- NILSSON S., GUSTAFSSON J.A. (2000): Estrogen receptor transcription and transactivation. Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res.*, 2, 360-366.
- NOLL G., LUSCHER T.F. (1998): The endothelium in acute coronary syndromes. *Eur. Heart J.*, 19, C30-38.
- NOWAK J., FITZGERALD G.A. (1989): Redirection of prostaglandin endoperoxide metabolism at the platelet-vascular interface in man. *J. Clin. Invest.*, 83, 380-385.
- OGLETREE M.L., HARRIS D.N., GREENBERG R., HASLANGER M.F., NAKANE M. (1985): Pharmacological actions of SQ 29,548, a novel selective thromboxane antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 234, 435-441.
- O'NEILL G.P., MANCINI J.A., KARGMAN S., YERGEY J., KWAN M.Y., FALGUEYRET J.P., ABRAMOVITZ M., KENNEDY B.P., OUELLET M., CROMLISH W., y col. (1994): Overexpression of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 by recombinant vaccinia virus: inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and biosynthesis of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Mol. Pharmacol.* 45, 245-254.
- OSPINA J.A., DUCKLES S.P., KRAUSE D.N. (2003): 17beta-estradiol decreases vascular tone in cerebral arteries by shifting COX-dependent vasoconstriction to vasodilation. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 285, 241-250.

- OSPINA J.A., KRAUSE D.N., DUCKLES S.P. (2002): 17beta-estradiol increases rat cerebrovascular prostacyclin synthesis by elevating cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase. *Stroke*, 33, 600-605.
- PAGANO P.J., ITO Y., TORNHEIM, GALLOP P.M., TAUBER A.I., COHEN R.A. (1995): An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am. J Physiol.*, 268 (Pt 2), H2274-H2280.
- PALMER R.M., FERRIGE A.G., MONCADA S. (1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526.
- PALMER R.M., MONCADA S. (1989): A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 158, 348-352.
- PARENTE L., PERRETTI M. (2003): Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem. Pharmacol.*, 65, 153-159.
- PATOCKA J., MERKA V., HRDINA V., HRDINA R. (2005): Pharmacological potential of endothelin receptors agonists and antagonists. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 48, 67-73.
- PAUL R.J., BOWMAN P.S., JOHNSON J., MARTIN A.F. (2007): Effects of sex and estrogen on myosin COOH-terminal isoforms and contractility in rat aorta. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 292, 751-757.
- PEDRAM A., RAZANDI M., AITKENHEAD M., HUGHES C.C., LEVIN E.R. (2002): Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J. Biol. Chem.*, 277, 50768-50775.
- PERUSQUIA M. (2003): Androgen-induced vasorelaxation: a potential vascular protective effect. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 111, 55-59.
- PERUSQUIA M., NAVARRETE E. (2005): Evidence that 17alpha-estradiol is biologically active in the uterine tissue: antiuterotonic and antiuterotrophic action. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 3, 30.
- POLLOCK J.S., FORSTERMANN U., TRACEY W.R., NAKANE M. (1995): Nitric oxide synthase isozymes antibodies. *Histochem J.*, 27, 738-744.
- POLLOCK J.S., KLINGHOFFER V., FORSTERMANN U., MURAD F. (1992): Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett.*, 309, 402-404.
- PROUDLER A.J., AHMED A.I., CROOK D., FOGELMAN I., RYMER J.M., STEVENSON J.C. (1995): Hormone replacement therapy and serum angiotension-converting enzyme activity in postmenopausal women. *Lancet.*, 346, 89-90.
- QUAN A., TEOH H., MAN R.Y. (1999): Acute exposure to a low level of testosterone impairs relaxation in porcine coronary arteries. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 26, 830-832.
- RADOMSKI M.W., PALMER R.M., MONCADA S. (1990): Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 87, 10043-10047.
- RAHMANIAN M., HELDIN P. (2002): Testicular hyaluronidase induces tubular structures of endothelial cells grown in three-dimensional collagen gel through a CD44-mediated mechanism. *Int. J. Cancer.*, 97, 601-607.
- RAMSAY R.G., CIZNADIJA D., VANEVSKI M., MANTAMADIOTIS T. (2003): Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 16, 59-67.
- RAPOPORT R.M. (1993): Potentiation of norepinephrine-induced contraction by primary prostaglandin receptor activation in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 243, 207-120.
- RAPOPORT R.M., SCHWARTZ K., MURAD F. (1985): Effect of sodium-potassium pump inhibitors and membrane-depolarizing agents on sodium nitroprusside-induced relaxation and cyclic guanosine monophosphate accumulation in rat aorta. *Circ. Res.*, 57, 164-170.
- RAPOPORT R.M., WILLIAMS S.P. (1996): Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension*, 28, 64-75.
- RASMUSSEN M., TAKUWA Y., PARK S. (1987): Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J.*, 1, 177-185.



- RAY C.J., MARSHALL J.M. (2006): The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. *J. Physiol.*, 570, 85-96.
- RAZMARA A., KRAUSE D.N., DUCKLES S.P. (2005): Testosterone augments endotoxin-mediated cerebrovascular inflammation in male rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 289, 1843-1850.
- REIS S.E., GLOTH S.T., BLUMENTHAL R.S., RESAR J.R., ZACUR H.A., GERSTENBLITH G., BRINKER J.A. (1994): Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation*, 4, 2545-2551.
- RENDT J.M., TORO L., STEFANI E., ERULKAR S.D. (1992): Progesterone increases  $Ca^{2+}$  currents in myometrial cells from immature and nonpregnant adult rats. *Am. J. Physiol.*, 262, C293-301.
- RHODIN J.A. (1980): *Architecture of vessel wall. The cardiovascular system II. Handbook of physiology.* ed. Bohr D.F., Somlyo A., Harvey V., Sparks J., pp.1-3. Maryland: American Physiological Society.
- RIVEIRO A., MOSQUERA A., CALVO C., ALONSO M., MACIA M., CORES M. (2001): Long-term effect of bilateral ovariectomy on endothelial function in aortic rings of spontaneously hypertensive rats: role of nitric oxide. *Gynecol. Endocrinol.*, 15, 158-164.
- ROBERTSON B.E., SCHUBERT R., HESCHELER J., NELSON M.T. (1993): cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 265, C299-C303.
- ROMANO M., CLARIA J. (2003): Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *FASEB J.*, 17, 1986-1995.
- ROSANO G.M., LEONARDO F., PAGNOTTA P., PELLICCIA F., PANINA G., CERQUETANI E., DELLA MONICA P.L., BONFIGLI B., VOLPE M., CHIERCHIA S.L. (1999): Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation*, 99, 1666-1670.
- RUIZ-VELASCO V., ZHONG J., HUME J.R., KEEF K.D. (1998): Modulation of  $Ca^{2+}$  channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ. Res.*, 82, 557-565.
- RUPNOW H.L., PHERNETTON T.M., MODRICK M.L., WILTBANK M.C., BIRD I.M., MAGNESS R.R. (2002): Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VIII. Estrogen and progesterone effects on cPLA2, COX-1, and PGIS protein expression. *Biol. Reprod.*, 66, 468-474.
- RUSSELL K.S., HAYNES M.P., SINHA D., CLERISME E., BENDER J.R. (2000): Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 97, 5930-5935.
- SADER M.A., CELERMAJER D.S. (2002): Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.*, 53, 597-604.
- SAGREDO A., BLANCO-RIVERO J., MARTÍN C.M., MARTORELL A., BALFAGÓN G., FERRER M. (2008): Ovariectomy increases the acetylcholine-induced relaxation in aorta from aged rats by modulating the NO-cGK pathway. *Endocrinology*, En revisión.
- SAITO H., NOGUCHI K., WINTERS S.J., KEEPING H.S., OSHIMA H., TROEN P. (1986): Testicular control of prostaglandin E2 production in rat vas deferens. *Endocrinology*, 119, 1733-1740.
- SALAMANCA D.A., KHALIL R.A. (2005): Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem. Pharmacol.*, 70, 1537-1547.
- SCHMITZ T., LEVINE B.A., NATHANIELSZ P.W. (2006): Localization and steroid regulation of prostaglandin E2 receptor protein expression in ovine cervix. *Reproduction*, 131, 743-750.
- SCHNAPER H.W., MCGUIRE J., RUNYAN C., HUBCHAK S.C. (2000): Sex steroids and the endothelium. *Curr. Med. Chem.*, 7, 519-531.
- SCHULZ R., NAVA E., MONCADA S. (1992): Induction and potential biological relevance of a  $Ca^{2+}$ -independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br. J. Pharmacol.*, 105, 575-580.

- SCHWANER I., OFFERMANN S., SPICHER K., SEIFERT R., SCHULTZ G. (1995): Differential activation of Gi and Gs proteins by E- and I-type prostaglandins in membranes from the human erythroleukaemia cell line, HEL. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1265, 8-14.
- SEILLAN C., ODY C., RUSSO-MARIE F., DUVAL D. (1983): Differential effects of sex steroids on prostaglandin secretion by male and female cultured piglet endothelial cells. *Prostaglandins*, 26, 3-12.
- SELLES J., POLINI N., ALVAREZ C., MASSHEIMER V. (2005): Related Articles, Novel action of estrone on vascular tissue: regulation of NOS and COX activity. *Steroids*, 70, 251-256.
- SEREBRYAKOV V., ZAKHARENKO S., SNETKOV V., TAKEDA K. (1994): Related Articles, Effects of prostaglandins E1 and E2 on cultured smooth muscle cells and strips of rat aorta. *Prostaglandins*, 47, 353-365.
- SEWDARSEN M., VYTHILINGUM S., JIALAL I., DESAI R., BECKER P. (1990): Abnormalities in sex hormones are a risk factor for premature manifestation of coronary artery disease in South African Indian men. *Atherosclerosis*, 83, 111-117.
- SHAY J., BADROW N., ATTELE A., LEVINSON M., MOSS J. (1993): Estrogen antagonists endothelin-1 vasoconstriction in rabbit basilar artery. *Anesth. Analg.*, A561.
- SHEEHAN M., WONG H.R., HAKE P.W., MALHOTRA V., O'CONNOR M., ZINGARELLI B. (2002): Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol. Pharmacol.*, 61, 953-963.
- SHIMOKAWA H. (1998): Endothelial dysfunction in hypertension. *J. Atheroscler. Thromb.*, 4, 118-127.
- SIMIONESCU N. (1983): Cellular aspects of transcapillary exchange. *Physiol. Rev.*, 63, 1536-1579.
- SIMONCINI T., MANNELLA P., FORNARI L., VARONE G., CARUSO A., GENAZZANI A.R. (2003): Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. *Endocrinology*, 144, 3449-3455.
- SMITH C.W., PRITCHARD K., MARSTON S.B. (1987): The mechanism of Ca<sup>2+</sup> regulation of vascular smooth muscle in filaments by caldesmon and calmodulin. *J. Biol. Chem.*, 262, 116-122.
- SMITH W.L., DEWITT D.L. (1996): Prostaglandin endoperoxide H synthase (cyclooxygenase)-1 and -2. *Adv. Immunol.*, 62, 167-215.
- SRINIVASAN D., FUJINO H., REGAN J.W. (2002): Differential internalization of the prostaglandin f(2alpha) receptor isoforms: role of protein kinase C and clathrin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302, 219-224.
- SRISAWAT S., PHIVTHONG-NGAM L., UNCHERN S., CHANTHARAKSRI U., GOVITRAPONG P., SANVARINDA Y. (2003): Improvement of vascular function by chronic administration of a cyclo-oxygenase inhibitor in cholesterol-fed rabbits. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 30, 405-412.
- STALLONE J.N., CROFTON J.T., SHARE L. (1991): Sexual dimorphism in vasopressin-induced contraction of rat aorta. *Am. J. Physiol.*, 260, H453-H458.
- STEWART K.G., ZHANG Y., DAVIDGE S.T. (2000): Aging increases PGHS-2-dependent vasoconstriction in rat mesenteric arteries. *Hypertension*, 35, 1242-1247.
- SULLIVAN J.C., SASSER J.M., POLLOCK D.M., POLLOCK J.S. (2005): Sexual dimorphism in renal production of prostanoids in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 45, 406-411.
- SUNANO S., SEKIGUCHI F. (2003): Endothelium-derived factors in hypertensive blood vessels, especially nitric oxide and hypertension. *Yakugaku Zasshi.*, 123, 495-515.
- TADDEI S., VANHOUTTE P.M. (1993): Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxane A2. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 22 (Suppl VIII), S328-S331.
- TANABE T., TOHNAI N. (2002): Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 68-69, 95-114.

- TANIOKA T., NAKATANI Y., SEMMYO N., MURAKAMI M., KUDO I. (2000): Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 275, 32775-32782.
- TANIYAMA Y., GRIENDLING K.K. (2003): Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42, 1075-1081.
- TEEDE H., VAN DER ZYPP A., MAJEWSKI H. (2001): Gender differences in protein kinase G-mediated vasorelaxation of rat aorta. *Clin. Sci. (Lond.)*, 100, 473-479.
- TEEDE H.J. (2007): Sex hormones and the cardiovascular system: effects on arterial function in women. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 34, 672-676.
- TEJERA N., BALFAGÓN G., MARÍN J., FERRER M. (1999): Gender differences in the endothelial regulation of alpha2-adrenoceptor-mediated contraction in the rat aorta. *Clin. Sci.*, 97, 19-25.
- TEJERA N., BALFAGÓN G., MARÍN J., FERRER M. (1999): Gender differences in the endothelial regulation of alpha2-adrenoceptor-mediated contraction in the rat aorta. *Clin. Sci. (Lond.)*, 97, 19-25.
- TEOH H., QUAN A., LEUNG S.W., MAN R.Y. (2000): Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.*, 129, 1301-1308.
- TOUYZ R.M. (2000): Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2, 98-105.
- TOUYZ R.M., SCHIFFRIN E.L. (2000): Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.*, 52, 639-672.
- TRIFAN O.C., HLA T. (2003): Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *J. Cell. Mol. Med.*, 7, 207-222.
- VALLE L.D., TOFFOLO V., NARDI A., FIORE C., BERNANTE P., DI LIDDO R., PARNIGOTTO P.P., COLOMBO L. (2006): Tissue-specific transcriptional initiation and activity of steroid sulfatase complementing dehydroepiandrosterone sulfate uptake and intracrine steroid activations in human adipose tissue. *J. Endocrinol.*, 190, 129-139.
- VALVERDE M.A., ROJAS P., AMIGO J., COSMELLI D., ORIO P., BAHAMONDE M.I, MANN G.E., VERGARA C., LATORRE R. (1999): Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science*, 285, 1929-1931.
- VANE J.R., BAKHLE Y.S., BOTTING R.M. (1998): Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 97-120.
- VANHOUTTE P.M., FELETOU M., TADDEI S. (2005): Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br. J. Pharmacol.*, 144, 449-458.
- VÁZQUEZ-PÉREZ S., NAVARRO-CID J., DE LAS HERAS N., CEDIEL E., SANZ-ROSA D., RUILOPE L.M., CACHOFEIRO V., LAHERA V. (2001): Relevance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the effects of hypertension on rat coronary relaxations. *J. Hypertens.*, 19, 539-545.
- VEDERNIKOV Y.P., LIAO Q.P., JAIN V., SAADE G.R., CHWALISZ K., GARFIELD R.E. (1997): Effect of chronic treatment with 17beta-estradiol and progesterone on endothelium-dependent and endothelium-independent relaxation in isolated aortic rings from ovariectomized rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 176, 603-608.
- VIZIOLI E.O., SPADIN M.D., CORRÊA F.M., VIARO F., EVORA P.R., CHIES A.B. (2005): Acetylcholine-induced aortic relaxation studied in salbutamol treated rats. *J. Smooth Muscle Res.*, 41, 271-281.
- WAKASUGI M., NOGUCHI T., KAZAMA Y.I., KANEMARU Y., ONAYA T. (1989): The effects of sex hormones on the synthesis of prostacyclin (PGI2) by vascular tissues. *Prostaglandins*, 37, 401-410.
- WANG H., MA W.G., TEJADA L., ZHANG H., MORROW J.D., DAS S.K., DEY S.K. (2004): Rescue of female infertility from the loss of cyclooxygenase-2 by compensatory up-regulation of cyclooxygenase-1 is a function of genetic makeup. *J. Biol. Chem.*, 279, 10649-10658.

- WANG W., SUN C., WANG X. (2002): Alteration of vascular response to norepinephrine, calcitonin gene-related peptide, and acetylcholine in orchidectomized rats. *Acta Pharmacol. Sin.*, 23, 985-990.
- WATANOBE H., YONEDA M. (2003): A mechanism underlying the sexually dimorphic ACTH response to lipopolysaccharide in rats: sex steroid modulation of cytokine binding sites in the hypothalamus. *J. Physiol.*, 547, 221-232.
- WEIDEMANN W., HANKE H. (2002): Cardiovascular effects of androgens. *Cardiovasc. Drug. Rev.*, 20, 175-198.
- WEINER C.P., LIZASOAIN I., BAYLIS S.A., KNOWLES R.G., CHARLES I.G., MONCADA S. (1994): Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 91, 5212-5216.
- WELLMAN G.C., BONEV A.D., NELSON M.T., BRAYDEN J.E. (1996): Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  channels. *Circ. Res.*, 79, 1024-1030.
- WHITE M.M., ZAMUDIO S., STEVENS R.T., TYLER R., LINDENFELD J., LESLIE K., MOORE L.G. (1995): Estrogen, Progesterone and vascular reactivity: Potencial Celular Mechanisms. *Endocr. Rev.*, 16, 739-751.
- WHITE R.E., HAN G., DIMITROPOULOU C., ZHU S., MIYAKE K., FULTON D., DAVE S., BARMAN S.A. (2005): Estrogen-induced contraction of coronary arteries is mediated by superoxide generated in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 289, H1468-7145.
- WIKLUND N.P., CELLEK S., LEONE A.M., INVERSEN H.H., GUSTAFSSON L.E. BRUNDIN L., FRUST V.W., FLOCK A., MONCADA S. (1997): Visualisation of nitric oxide released by nerve stimulation. *J. Neurosci. Res.*, 47, 224-232.
- WILLIAMS J.K., ADAMS M.R., KLOFENSTEIN H.S. (1990): Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*, 81, 1680-1687.
- WILLIAMS S.P., DORN G.W., RAPOPORT R.M. (1994): Prostaglandin I<sub>2</sub> mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 267, H796-803.
- WISE H., WONG Y.H., JONES R.L. (2002): Prostanoid signal integration and cross talk. *Neurosignals*, 11, 20-28.
- WITTER F.R., DIBLASI M.C. (1984): Effect of steroid hormones on arachidonic acid metabolites of endothelial cells. *Obstet. Gynecol.*, 63, 747-751.
- WOLIN M.S. (2000): Interaction of oxidants with vascular signaling system. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 1430-1442.
- WON E., WON J., KWON S., LEE Y., NAM T., AHN D. (2003): Testosterone causes simultaneous decrease of  $[\text{Ca}^{2+}]$  and tension in rabbit coronary arteries: by opening voltage dependent potassium channels. *Yonsei. Med. J.*, 44, 1027-1033.
- WONG C.I., ZHOU Z.X., SAR M., WILSON E.M. (1993): Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH<sub>2</sub>-terminal and steroid-binding domains. *J. Biol. Chem.*, 268, 19004-19012.
- WU W.X., MA X.H., NATHANIELSZ P.W. (1999): Changes in prostacyclin synthase in pregnant sheep myometrium, endometrium, and placenta at spontaneous term labor and regulation by estradiol and progesterone. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 180, 744-749.
- YAGAMI T., TOHKIN M., MATSUBARA T. (1994): The involvement of the stimulatory G protein in sexual dimorphism of beta-adrenergic receptor-mediated functions in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1222, 257-264.
- YAMAGUCHI K., HONDA H., WAKISAKA C., TOHEI A., KOGO H. (2001): Effects of phytoestrogens on acetylcholine- and isoprenaline-induced vasodilation in rat aorta. *Jpn. J. Pharmacol.*, 87(1), 67-73.
- YANAGISAWA M., MASAKI T. (1989): Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem. Pharmacol.*, 38, 1877-1883.

- YOREK M.A., COPPEY L.J., GELLETT J.S., DAVIDSON E.P., BING X., LUND D.D., DILLON J.S. (2002): Effect of treatment of diabetic rats with dehydroepiandrosterone on vascular and neural function. *Am. J. Physiol.*, 283, 1067-1075.
- YOSHIDA K., OKAMURA T., TODA N. (1994): Histological and functional studies on the nitroxidergic nerve innervating monkey cerebral, mesenteric and temporal arteries. *Jpn. J. Pharmacol.*, 65, 351-359.
- YUE P., CHATTERJEE K., BEALE C., POOLE-WILSON P.A., COLLINS P. (1995): Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation*, 91, 1154-1160.
- YURA T., FUKUNAGA M., KHAN R., NASSAR G.N., BADR K.F., MONTERO A. (1999): Free-radical-generated F2-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int.*, 56, 471-478.
- ZAMORANO B., BRUZZONE M.E., MARTINEZ J.L. (1994): Influence of the estrous cycle on the norepinephrine-induced contraction of rat aorta: relationship to vascular prostanoids biosynthesis. *Biol. Res.*, 27, 209-215.
- ZAMORANO B., BRUZZONE M.E., MARTINEZ J.L. (1995): Vascular smooth muscle reactivity to norepinephrine in ovariectomized rats: relationship to vascular PGE2/PGF2 alpha ratio. *Gen. Pharmacol.*, 26, 1613-1618.
- ZHANG H., XIAO D., LONGO L.D., ZHANG L. (2006): Regulation of alpha1-adrenoceptor-mediated contractions of uterine arteries by PKC: effect of pregnancy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H2282-2289.
- ZHANG L., FUJII S., KOSAKA H. (2007): Effect of oestrogen on reactive oxygen species production in the aortas of ovariectomized Dahl salt-sensitive rats. *J. Hypertens.*, 25, 407-414.
- ZHOU S.H., LING H.Y., TIAN S.W., LIU X.Q., WANG B.X., HU B. (2005): [17beta-estradiol protects against injury of aortic relaxation and contraction in ovariectomized rats with insulin resistance induced by fructose.] *Sheng. Li. Xue. Bao.*, 57, 627-635.